

# 新規深海性微生物が生産する細胞外高分子物質に関する研究

著者	緒方 亜実
学位授与機関	東京海洋大学
学位授与年度	2011
URL	<a href="http://id.nii.ac.jp/1342/00001292/">http://id.nii.ac.jp/1342/00001292/</a>

修士学位論文

新規深海性微生物が生産する細胞外高分子物質に関する研究

平成 23 年度

(2012 年 3 月)

東京海洋大学大学院

海洋科学技術研究科

海洋環境保全学専攻

緒方 亜実

第1章	序論	
1.1	はじめに	1
1.2	菌体について	
1.2.1	EPS 生産菌の分離	2
1.2.2	菌の性状	
1.2.3	スクリーニング	3
第2章	方法	
2.1	培養	4
2.1	生産物の回収	5
2.3	生産物の組成分析	6
2.3.1	構成糖分析（中性糖）	
2.3.1.1	試料の加水分解	
2.3.1.2	試料の還元とアセチル化	
2.3.1.4	GC/MS 分析装置と分析条件	7
2.3.1.4	検量線の作成	
2.3.2	ウロン酸分析	9
2.3.2.1	試薬の調製	
2.3.2.2	m-ヒドロキシビフェニル法によるウロン酸の定量	
2.3.2.3	検量線の作成	
2.3.3	タンパク質分析	10
2.3.3.1	Bradford 法によるタンパク質の定量	
2.3.3.2	検量線の作成	
2.3.4	アミノ酸分析	11
2.4	FT-IR 分析	
2.5	分子量測定	
2.5.1	GPC による分子量決定	
2.5.2	検量線の作成	

2.6	イオン交換クロマトグラフィー	13
2.6.1	溶離液の調製	
2.6.2	分離	
2.6.3	各フラクションの分析	14
2.6.3.1	フェノール硫酸法による全糖量の測定	
2.6.3.2	検量線の作成	
第3章	結果と考察	15
3.1	培養	
3.2	生産物の回収	16
3.3	生産物の組成	17
3.3.1	構成糖分析	
3.3.2	ウロン酸分析	19
3.3.3	タンパク質分析	
3.3.4	各 EPS 組成の比較と構成多糖の推察	
3.3.5	アミノ酸分析	21
3.4	FT-IR 分析	
3.5	分子量測定	22
3.6	イオン交換クロマトグラフィー	23
第4章	総括	24
謝辞		26
参考文献		27
図表		29

## 第1章 序論

### 1.1 はじめに

産業の発展とともに、深刻化する世界規模での資源枯渇や環境問題への懸念が拡大する中、安定した生産性と、自然環境中で微生物により分解される生分解性をもつ EPS (Extra Polymeric Substance : 細胞外高分子物質) への注目が高まっている。今日の日常生活に不可欠なプラスチック製品などの高分子物質は、高性能と長期安定化を求めて開発・製造されたため、環境中に流出した場合に長期に渡って残存し、自然環境の汚染や野生動物への被害の原因になる事が問題視されている。微生物が生産する EPS には多糖類 (セルロースプルラン、カードランなど)、ポリアミノ酸 (ポリグルタミン酸、ポリリシン)、ポリエステル (ポリヒドロキシアルカノエート、その共重合体) などがあり、化学合成系の高分子物質の代替品として注目され、研究が行われている。

また、微生物によって生産される EPS は様々で、その物性や応用例も多様である。極限環境と言われる極寒の極地や塩濃度の高い死海、pH の極端な温泉地帯、高圧・低温の深海などに生育する微生物は環境に適応した特殊な代謝機構をもつことが考えられており、その EPS も特異な性質をもつことが期待される。しかし、陸上由来の菌に対して海洋、特に深海由来の EPS 生産菌の報告例は少ないのが現状である。

一般的に深度 1000m 以深を深海と呼び、水深によって 3 層 (漸深層 ; 1000~3000m、深海層 ; 3000~6000m、超深海層 ; 6000m 以深) に区分されている。超深海層では、かかる圧力は 60MPa 以上になり、栄養分となる有機物量も少なく生物量も減少するが、高深度になるにつれてより高圧環境に適応した生物や微生物が存在することが知られている<sup>1,2)</sup>。また、深海では熱水噴出孔が数カ所発見されている。熱水噴出孔とは、海底の火山活動が活発な地点で、硫化物や 300℃を超える熱水が噴き出すため、超好熱性細菌や化学合成細菌などが多く存在し、特有の生態系をもつホットスポットである。熱水噴出孔から単離された EPS 生産菌は主に *Pseudoalteromonas*, *Alteromonas*, *Vibrio* の 3 属が報告されている<sup>3)</sup>。深海を対象とした研究

の中では、熱水噴出孔を対象とした研究が多く、超深海由来の EPS 生産菌の探索・単離の報告例は著者の知る限り存在しない。

EPS は生産菌によってその物性は異なるが、培養条件によっても組成や構造、生産効率が変化することが分かっている<sup>4)</sup>。

本研究では、(独)海洋研究開発機構の採取した日本海溝の深度 5000～6000m の海泥より新規に単離された EPS 生産菌 2'-1 株と 4B 株を用い、それらの EPS について生産と培養条件との相関および化学構造の特徴を明らかにすることを目的とした。

## 1.2 菌体について

### 1.2.1 EPS 生産菌の分離

菌体は、(独)海洋研究開発機構の「ハイパードルフィン」(Fig.1、2)による調査潜航 NT08-24 にて無菌採泥機を用いて無人探査機採取された日本海溝深海の泥から分離した。2 カ所の採取地点 (St.1: 6K#950Cw; 40° 6.045' N、 144° 10.9971' E、深度 6181 m と St.2: 6K#1160; 39° 6.3295' N、 143° 53.563' E、深度 5347 m) から得られた底泥を寒天培地上に塗布し、粘性のあるコロニーを形成したポリマー生産菌を選抜し、4B 株と 2'-1 株と名付けた。底泥を採取した各地点の場所と海底の写真を Fig.3 と Table.1 に示した。これらの底泥の採取地点にはシロウリガイなど深海特有の生物がコロニーを形成していた。

### 1.2.2 菌の性状

EPS 生産菌 2 株の性状を Fig.4、5 に示した<sup>5)</sup>。至適増殖圧力、至適増殖塩濃度、至適増殖温度を測定した結果、2'-1 株は至適増殖温度約 48℃の中温性、好塩性、耐圧性の微生物であった。4B 株は至適増殖温度 38℃の中温性、耐塩性、好圧性の微生物であった。圧力に対して、30,50 MPa でも増殖性を維持できるものは耐圧性微生物、大気圧化での生育と比較して高圧化でより良好に生育できるものは好圧性微生物、大気圧化で増殖が阻害され、加圧化でのみ生育

できるものは絶対好圧性微生物と呼ばれ、これらのうち、好圧性と絶対好圧性微生物は特異的な代謝機構など、他の微生物にはない特徴を有していると考えられる。そのため深海環境を対象にスクリーニングが行われてきたが、これまで報告されている好圧性、絶対好圧性微生物は非常に少ない。

また、SEM（走査型電子顕微鏡）と TEM（透過型電子顕微鏡）による菌体の形態観察の結果、2'-1 株は鞭毛をもつ桿状菌であり（Fig.6 A、B、C）、4B 株は鞭毛をもたず運動性のない球状菌であることが分かっている（Fig.7 A、B、C）。どちらにもネット状に菌体にからむ EPS が確認された。

### 1.2.3 スクリーニング

分離した 2 株について、16S rRNA 遺伝子の配列の決定と近隣結合法による系統樹が作成された（Fig.8）。その結果、4B 株と *Kocuria rosea* は 99.8% の高い相同性を示したが、各種の性状比較によって以下のような差異が明らかになっており、新種の可能性が高いとされている。*K. rosea* は至適増殖圧力が 0.1 MPa と 4B 株に比べて圧力耐性がとても低い。また、プレート状のコロニーの色も大きく異なり、4B 株は薄い黄色なのに対し、*K. rosea* は鮮やかなバラ色である（Fig.9）。2 株を液体培養した後、4B 株からはアルカリ処理によって繊維状の沈殿（Fig.18）が得られるのに対し、*K. rosea* は溶液全体が濁るが沈殿が見られない。電子顕微鏡による形態観察では、菌体の形態は似ていたが、4B 株ではネット状の生産物が視認できたのに対し、*K. rosea* では菌体表面に小さな粒状の物質が付着していた。

## 第2章 方法

### 2.1 培養

日本海溝の深度 5000～6000m の海泥から新規に分離された EPS 生産菌 2 株について、各プレートから釣菌して LBN 培養液 (Table.2) 2 ml が入った試験管に加え、37 °C、振盪速度 160 rpm で 12 時間培養したものを前培養液とし、培養液の 0.2 %量(v/v)加えて本培養を行った。本培養は 2 株からより多くのポリマーが回収できる培養方法を検討した。液体培地または寒天培地と液体培地の二層培地の 2 種で生産物の回収量を比較し、また、培地へのグルコース添加の有無による影響も比較した。検討後は以下の培養方法に固定して培養を行った。2'・1 株はルービンを用いて寒天培地と液体培地の二層培地 (Fig.8)で 42 °Cで 24 時間静置培養、4B 株は三角フラスコを用いて液体培地 (Fig.9) で 37 °C、振盪速度 160 rpm で 24 時間振盪培養を行った。

Table.2 LBN 培地の組成

組成	添加量
Trypton	1.0%
Yeast Extract	0.5%
NaCl	3.0%

Table.3 LBNG 培地

組成	添加量
Trypton	1.0%
Yeast Extract	0.5%
NaCl	3.0%
Glucose	3.0%



## 2.2 生産物の回収

Fig.12 にあるフローチャートに沿って培養液からポリマー生産菌の生産物を回収した。本研究ではポリマー生産菌の生産物には、菌体に付着している生産物（Cell Bound：以下 CB とする）と培地に可溶で菌体から遊離している生産物（Extracellular：以下 Ex とする）と 2 種類に分別してそれぞれを回収した。

培養液を 50 ml 遠心チューブに移し、回転数 9000 rpm で 30 分遠心して上清①と沈殿①に分離した。上清①は 10 倍量の 99.5 %冷エタノールで処理し、培地中に遊離していた Ex-1 の沈殿を回収して減圧乾燥した。また 2'-1 株について、上清①を 10kDa カットのクロスフローユニットを用いて限外ろ過し、回収後凍結乾燥したものを Ex-2、回収後にエタノール沈殿させて凍結乾燥したものを Ex-3 とした。沈殿①に混在する培地成分を除去するため DDW を加え懸濁し、遠心した。得られた沈殿②は生産物と菌体が付着した状態なので 0.25 M NaCl を 15 ml 加えよく懸濁した後 30 °C で 2 時間、振盪速度 160 rpm で振盪し、アルカリ処理を行い遠心した。得られた上清③に 10 倍量の 99.5 %冷エタノールを加え 24 時間冷却・静置した後遠心し、得られた沈殿を菌体からはがれた CB として回収し、減圧乾燥した。菌体を含む沈殿③にはさらに 1MNaCl を加え 35 °C で 20 時間さらに処理し、遠心した。得られた上清④を 24 時間冷却・静置した後 10 倍量の 99.5 %冷エタノールを加え、24 時間冷却した後遠心し、CB-2 の沈殿を得た。

## 2.3 生産物の組成分析

回収した生産物の組成を明らかにするため各種実験を行った。

### 2.3.1 構成糖分析（中性糖）

#### 2.3.1.1 試料の加水分解

試料を乾燥重量で 100 mg（または 20 mg）精秤し、100 ml 容ビーカー（または試験管）に入れた。精秤した試料に、72 %硫酸を 5 ml（または 1.5 ml）添加し、試料の塊がなくなるように、ガラス棒で攪拌しながら 2.5 時間浸漬した。硫酸浸漬試料を 300 ml 容（または 100 ml 容）三角フラスコに 150 ml（または 50 ml）の蒸留水でビーカー（試験管）をリンスしながら移し、120 °C、1 時間オートクレーブ処理をした。オートクレーブ試料を室温まで放冷した後、内部標準物質のイノシトール水溶液（10 mg/ml）を 1 ml（または 62.5  $\mu$ l）添加して、ADVANTEC No.1 のろ紙を用いてろ過した。ろ液を蒸留水で 300 ml（または 100 ml）にメスアップした。（試料が 20 mg の場合はここで 60 ml をとってエバポレーターで 10 ml に減圧濃縮した）

#### 2.3.1.2 試料の還元とアセチル化

2.3.1.1 で得たろ液を 40 ml（または 10 ml）採り、飽和水酸化バリウム水溶液で pH 3~4 に調整した後、0.1 M の水酸化バリウム水溶液で pH 5.5~6.5 に調整した。中和した試料を遠心分離処理(5000 rpm、10 分) し、上清 20 ml（または 40 ml）を 300 ml 容ナス型フラスコに移し、水素化ホウ素ナトリウムを 70 mg 添加して 2 時間、室温で放置した。

2 時間後、過剰な水素化ホウ素ナトリウムを分解するために、発泡がなくなるまで酢酸を添加した。次に、酢酸を除去するために、エバポレーター(40 °C)で減圧濃縮した。更に、酢酸臭がしなくなるまで、メタノールを加えて減圧濃縮する操作を繰り返し、最終的に、蒸発乾固させて白い結晶が析出した時点でこの操作を終えた。結晶を含むフラスコに 4 ml（または 1 ml）の無水酢酸を加え、120 °C のオーブンで 1 時間加熱した。加熱した試料を室温まで放冷した後、

ポアサイズ 0.20  $\mu\text{m}$  の Syringe Driven Filter Unit (Milex-LG)でろ過し、バイアルビンに移し、GC/MS 分析に供した。

### 2.3.1.3 GC/MS 分析装置と分析条件

GC/MS 分析には、オートサンプラーAOC-20i を付した GCMS-QP5050A (島津製作所製) と DB-5 カラム (J&W Scientific 長さ 30 mm、内径 0.25 mm、膜厚 0.25  $\mu\text{m}$ 、液相：微極性) を使用した。GC のカラム槽温度は、初期温度 180  $^{\circ}\text{C}$  で 5 min 保持、その後 210  $^{\circ}\text{C}$  まで 3  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  昇温した。その他の条件は平衡待時間 ; 0.5 min、気化室温度 ; 280  $^{\circ}\text{C}$ 、インターフェース ; 280  $^{\circ}\text{C}$ 、キャリアガス圧 ; 100 KPa、カラム流量 ; 1.0 ml/min、スプリット比 ; 20 (または 10) とした。MS は走査質量範囲 ; 40~400、溶媒溶出時間 ; 6 min、測定 ; 6.0~15.0 min で行った。

### 2.3.1.4 検量線の作成

中性糖分析にあたり、GC/MS 分析で検出されたピークから糖の重量を算出するために検量線を作成した。フコース、キシロース、ラムノース、マンノース、グルコース、ガラクトース、イノシトールを用い、それぞれ約 10 mg/ml の水溶液を調製した。(Table.4) イノシトールは内部標準物質として使用した。調製した各単糖の水溶液を Table.5 に示す A、B、C、D、E の割合で混合溶液を作製し、アルジトール・アセテートに変化した後 GC/MS 分析に供した。

Table.4 各単糖の水溶液濃度

単糖	濃度 (mg/ml)
イノシトール	10.004
ラムノース	10.004
フコース	10.000
アラビノース	10.000
キシロース	10.006
マンノース	10.002
グルコース	10.004
ガラクトース	10.000

Table.5 検量線試料 A、B、C、D、E の水溶液組成 ( $\mu$ l)

	A	B	C	D	E
イノシトール	10	30	100	30	100
ラムノース	10	100	30	30	100
フコース	30	10	100	100	30
アラビノース	100	30	10	30	100
キシロース	100	100	100	10	10
マンノース	100	30	10	100	30
グルコース	100	10	30	100	30
ガラクトース	30	10	100	30	100

## 2.3.2 ウロン酸分析

### 2.3.2.1 試薬の調整

m-フェニルフェノール 150 mg を秤量して 100 ml 容ガラスビーカーに加え、ここへ 0.5 % (wt / vol) NaOH 水溶液 100 ml を加えた。一晚浸漬して、m-フェニルフェノールを完全に溶解させ、0.15 % ( wt / wt) の溶液を得た。4 °C で保存した。四ホウ酸ナトリウム 477 mg を濃硫酸で 100 ml にメスアップして 0.0125 M Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 溶液を調製した。4 °C で保存した。

### 2.3.2.2 m-ヒドロキシビフェニル法によるウロン酸の定量

サンプル 25 mg を試験管に採り、72 %硫酸 (wt / vol) 1 ml を加え、2 時間浸漬させた。浸漬後、蒸留水で 50 ml にメスアップした。次に、メスアップした試料を試験管に 0.2 ml 入れた。平均値を採るために試料 1 つにつき、3 本調製した。試料によってウロン酸濃度が違うため、検量線内に適正值がでない場合にはメスアップした試料を更に、2～5 倍希釈して試験管に 0.2 ml 入れた。試験管を氷水で冷却しながら 0.0125 M Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 溶液 1.2 ml をゆっくり加えた。ボルテックスで試験管を攪拌した後、試験管にアルミホイルでふたをし、沸騰湯浴中で 5 分間加熱した。流水で冷却した後、m-ヒドロキシビフェニル溶液 10 μl を添加し、ボルテックスで攪拌して室温で 5 分間放置した。その後、1 時間以内に 520 nm の吸光度を測定した。ブランクとして試料 0.2 ml のかわりに、0.5% ( wt / wt ) NaOH 水溶液 0.2 ml 加えたものを使用した。試料の吸光度からブランクの吸光度を引いた値と後述の検量線を用い、ウロン酸の定量を行った。

### 2.3.2.3 検量線の作成

m-ヒドロキシビフェニル法によるウロン酸の定量にあたり、標準物質としてガラクトuron酸を使用して検量線を作成した。5, 10, 25, 50, 100 μg/ml の各ウロン酸水溶液をそれぞれ調製した。試験管を 6 本用意し、そのうちの 5 本に各濃度のウロン酸水溶液を 0.2 ml 添加し、

残りの 1 本にブランクとして蒸留水 0.2 ml を加えた。以下の操作は 2.3.2.2 と同様に行った。

### 2.3.3 タンパク質分析

#### 2.3.3.1 Bradford 法によるタンパク質の定量

サンプル中に含まれるタンパク質を定量した。タンパク質含量が検量線内に収まるよう 1~2 mg を精評し、蒸留水に溶解した。Bradford 試薬は CBB-G25 200 mg (最終濃度は 0.01 %) とエタノール 100 ml (最終濃度は 5 %) をスターラーでよく攪拌し、85 %Phosphoric acid 200 ml (最終濃度は 8.5 %) を加え、蒸留水で 2 L に定容後ろ過したものを使用した。試験管に各濃度に希釈した BSA 試薬と試料 100  $\mu$ l を 3 本ずつ入れ、そこに Bradford 試薬を 1 ml 加えボルテックスミキサーでよく攪拌した。5~30 分間に分光光度計で 595 nm の吸光を測定し、平均値を採るために試料 1 つにつき、3 本調製した。

#### 2.3.3.2 検量線の作成

Bradford 法によるタンパク質の定量にあたり、スタンダードとして 0.0821 mg/ml に溶解した BSA (ウシ血清アルブミン) 試薬を用い検量線を作成した。スタンダードは BSA と DW を Table.6 の割合で溶液を調製した。

Table.6 BSA スタンダードの組成

試料	0.0821mg/ml BSA( $\mu$ l)	DW( $\mu$ l)	試験管 1 本あたりの BSA 量( $\mu$ g)
1	0	100	0
2	20	80	1.642
3	40	60	3.284
4	60	40	4.926
5	80	20	6.568
6	100	0	8.21

### 2.3.4 アミノ酸分析

2'・1 株の Ex と 4B 株の CB サンプルのアミノ酸分析を味の素株式会社に外注した。

## 2.4 FT-IR 分析

サンプルの赤外吸収スペクトル測定を行った。測定機器はフーリエ変換型赤外分光光度計 (FTIR 6100, JASCO) を用い、波長域 550~4000  $\text{cm}^{-1}$ 、積算回数 80 回の条件で行った。粉末状の試料を測定部に密着させ、空気をバックグラウンドとして全反射吸収 (ATR) 法により測定した。

## 2.5 分子量測定

### 2.5.1 GPC による分子量決定

サンプルの分子量をゲル濾過クロマトグラフィー (GPC) を用いて測定した。GPC 装置、検出器はそれぞれ 10A GPC システム (株SHIMADZU)、RID-10A 示差屈折計 (株SHIMADZU) を用いた。カラムは SUGAR KS 806 と SUGAR KS-G (ガードカラム) を使用し、溶離液は MilliQ を用いた。速度 0.8  $\text{ml/min}$ 、カラム温度は 60  $^{\circ}\text{C}$  の条件で測定した。溶離液に溶かした試料をシリンジに注入し、ポアサイズ 0.45  $\mu\text{m}$  のメンブレンフィルター (Millipore, PTEE) を用いて濾過したものを測定に用いた。GPC への注入量は 20  $\mu\text{L}$  とした。

### 2.5.2 検量線の作成

検量線は、Pullulan スタンダード P-82 (P-5 ~ 800) と P-2500 (Shodex) (Table.7) を用いて作成し、相対分子量を決定した。分子量の異なる 9 種のスタンダードは分離後の各ピークの間隔を広げ、明確にするために、A 液と B 液の 2 つに分けて標準液を調製した。試料を 1  $\text{mg}$  精評し、10  $\text{ml}$  容メスフラスコも用いて MilliQ で定容した。

Table.7 プルランスタンダード

液名	Grade	$M_p \times 10^{-4}$	$M_w \times 10^{-4}$	$M_n \times 10^{-4}$	$M_w/M_n$
A	P-2500	235	256	172	1.49
B	P-800	70.8	80.5	63.6	1.27
A	P-400	34.4	36.6	31.8	1.15
B	P-200	20.0	21.0	18.9	1.11
A	P-100	10.7	11.3	10.0	1.13
B	P-50	4.71	4.88	4.55	1.07
A	P-20	2.11	2.17	2.00	1.09
B	P-10	0.96	1.00	0.92	1.09
A	P-5	0.59	0.60	0.55	1.09



## 2.6 イオン交換クロマトグラフィー

### 2.6.1 溶離液の調製

Tris を 121.1 g 精評し、1 L 容ビーカーに入れ、約 800 ml の MilliQ を加え、スターラーで攪拌しながら溶解した。pH メーターで溶液の pH を測定しながら HCl を pH8.0 になるまで加えた。Tris 溶液の pH は温度に大きく依存するので、これを室温まで冷ました後再度 pH 調整を行った。1 L 容メスシリンダーに移して MilliQ で 1L に定容し、1M Tris-HCl を調製した。カラムに流すときはこれを MilliQ で 0.01 M に希釈して使用し、これを溶離液 A とした。この A 液 500 ml に吸引ろ過した 1 M NaCl 500 ml を混合したものを B 液とした。

### 2.6.2 分離

分離には DEAE Sepharose Fast Flow (GE Healthcare) を内径 2.5cm、長さ 30cm のカラム (BIORAD) に充填したものを使用した。溶離液は A 液と B 液を Table.8 のようにグラジエントポンプを用いて混合しイオン勾配をつけて流速 2 ml/min で流した。4B の CB2 4mg を A 液 10 ml に溶解したものをサンプルとし、ピペットを用いて界面を乱さないよう静かにカラムに添加した。フラクションコレクターを用いて試験管 1 本あたり 2 分間で 4 ml 回収し、合計約 600 ml を回収した。

Table.8

総流量 (ml)	A 液 (%)	B 液 (%)
0	100	0
120	100	0
720	0	100
840	0	100
850	100	0

### 2.6.3 各フラクションの分析

フェノール硫酸法により溶出液に含まれる全糖量の測定を行った。フラクション 150 本の測定数を減らすため、1 本から 500  $\mu$ l をとり 10 本を 1 サンプルとして 15 サンプルにまとめた。

(①～⑮とする) これを凍結乾燥させて 10 倍に濃縮し、500  $\mu$ l にした。全糖量測定後、含量が多かったフラクションを溶媒除去と濃縮のため遠心フィルター (Amicon Ultra 10K membrane) で MilliQ とともに遠心を 3 回行い、GPC 分析に供した。

#### 2.6.3.1 フェノール硫酸法による全糖量の測定

①～⑮のサンプル 500  $\mu$ l をそれぞれ試験管に入れ、5% (w/v) フェノール溶液を 500  $\mu$ l 加え、ボルテックスミキサーで攪拌した。濃硫酸 2.5 ml を液面に直接、勢いよく (試験管の壁を伝わらず) 入れ、ボルテックスミキサーで攪拌した。20 分後、490 nm の吸光度を測定した。

#### 2.6.3.2 検量線の作成

試料中の単糖の含量を算出するにあたり、標準物質としてグルコースを用い検量線を作成した。グルコース 1.0 mg を精評し、1 ml の MilliQ に溶解した。これを希釈して Table.9 の濃度の水溶液を調製した。2.6.2.3.1 の通り操作を行い、検量線を作成した。

Table.9

	グルコース濃度 ( $\mu$ g/ml)	500 $\mu$ g 中のグルコース ( $\mu$ g)
1	0	0
2	25	125
3	50	250
4	75	375
5	100	100

### 第3章 結果と考察

#### 3.1 培養

日本海溝の深度 5000～6000m の海泥から分離した EPS 生産菌 2'-1 株と 4B 株について、より多くの EPS を回収できる培養条件を検討した。その結果 2'-1 株では、CB と Ex 共に液体培地よりも固液二層培地で培養した場合に収量が多かった (Fig.13、Table.10)。グルコースを添加しない培地でも EPS の生産が確認され、二層培地では CB と Ex の合計収量がグルコース添加の場合に多かったが、液体培地ではグルコース無添加の場合で収量がやや多かった。EPS 総量としては、グルコース添加の二層培地で培養を行った場合に最も多く回収できたため、2'-1 株の EPS の回収はグルコース添加の二層培地で培養することに決定した。

4B 株からは、グルコース無添加培地上では CB を回収できなかった。CB と Ex の合計収量は二層培地の場合に多かったが、CB がほとんど回収できなかったため (Fig.14、Table.11)、4B 株の EPS の回収はグルコース添加の液体培地で培養することに決定した。

また、培養時間の決定は以下の先行研究を参考にした<sup>6)</sup>。4B 株培養の際の培地の pH、吸光度 (660nm)、菌体増殖の経時変化 (Fig.15)、および CB と Ex の回収量の経時変化 (Fig.16) の観察によれば、培地の吸光度は培養開始から対数的に上昇し、菌体の増殖を示すが、24 時間以降はほぼ一定となり、定常期に入ることがわかった。同様に培地の pH は 24 時間までは低下し、その後一定となっている。グラフが横ばいになっていた。これは対数増殖期に菌の増殖とともに酸性物質である EPS が培地中に産出され、培地の pH が低下し、定常期に入ると同時に EPS の生産が停止したか、もしくは EPS の生産と菌による EPS の消化が平衡に達したためと示唆された。また、EPS の回収の経時変化より、CB、Ex とともに 24 時間培養で回収量が最大になり、その後は減少する傾向が確認された。特に CB の減少率が高く、CB はグルコース無添加の培地では生産されないことから、24 時間経過した時点で培地中にグルコースが不足し、代わりに EPS (特に CB) を栄養として消化していると考えられた。4B 株は培養 24 時間で増殖、EPS の生産量ともに最大となり、その後は定常期に入り EPS を消化している

と示唆された。以上のことから、本培養の時間は EPS の回収量が最大となる 24 時間で行うこととした。

### 3.2 生産物の回収

Fig.12 のフローチャートに従って培養液から EPS を回収した。同種のサンプルは EPS の回収日をサンプル名とした。本培養後、2'-1 株の培養液上層部には薄いピンク色の物質が全体に広がっており、これを精製した 2'-1 株の CB は水溶性で Fig.17 のようなゲル状物質であった。

4B 株の培養液中には明確な固体は発生せず、培地中に微粒子が発生して濁りを与えた。精製後の CB は水に難溶性であり、形状は 2'-1 株の EPS と異なり、繊維状であった (Fig.18)。また、アルカリ処理前後の菌体を SEM によって観察したところ、菌体同士をつなぐようにネット状に菌体周辺に存在した EPS が、アルカリ処理後には確認されず、処理によってほぼ完全に回収・除去されていることが視認できた (Fig.19、20) <sup>5)</sup>。以上のことから、菌体に付着していた EPS がアルカリ処理によって可溶化し、CB として回収されていると判断した。

### 3.3 生産物の組成

#### 3.3.1 構成糖分析

各単糖の含量を測定するにあたって作成した検量線作成用試料の TIC を Fig.21~25 に、検量線を Fig.26~30、 Table.12~16 に示した。

各 EPS 試料のアルジトールアセテートの TIC を Fig.31~33 に示した。サンプルの重量に対する各単糖の含有率を Table.20~23 に示した。また、2'-1 株のグルコース添加培地由来の CB と Ex は 1 サンプルの分析結果のみ Fig.35 と Fig.37 のグラフに示した。

##### 【2'-1\_CB】

2'-1 株のグルコース添加培地の CB に含まれる中性糖は 13.3~18.19% (wt/wt)であり、その組成はラムノース 0~2.26 % (中性糖中 4 ~17 %)、マンノース 0.43~0.799 % (中性糖中 3~5 %)、グルコース 0.42~0.80 % (中性糖中 2 ~6 %)、ガラクトース 9.64~16.96 % (中性糖中 73 ~93 %)であった。グルコース無添加の培地の CB に含まれる中性糖は 24.84 %であり、その組成はラムノース 1.74 % (中性糖中 7 %)、マンノース 0.78 % (中性糖中 3 %)、グルコース 0.58% (中性糖中 2 %)、ガラクトース 21.75 % (中性糖中 88 %)であった。中性糖の含有量はグルコース無添加培地の CB の方が多かったが、糖組成は同様であった。

##### 【2'-1\_Ex-1】

2'-1 株のグルコース添加培地の Ex に含まれる中性糖は 25.92~56.87 %であり、その組成はラムノース 0~0.93 % (中性糖中 0~2 %)、キシロース 0 ~1.77 % (中性糖中 1 ~3 %)、マンノース 9.27~26.16 % (中性糖中 36 ~41 %)、グルコース 2.27~5.72 % (中性糖中 9 ~10 %)、ガラクトース 13.98~25.43 % (中性糖中 44 ~54 %)であった。グルコース無添加培地の Ex は中性糖を 57.81%含有し、その組成はラムノース 0.42 % (中性糖中 1 %)、キシロース 1.77 % (中性糖中 3 %)、マンノース 26.16 % (中性糖中 45 %)、グルコース 4.01 % (中性糖中 7 %)、ガラクトース 25.43 % (中性糖中 44 %)であった。CB と同様にグルコース添加の有無に関わらず中性糖の総量と糖組成は同様であった。

#### 【2'-1\_Ex-2】

2'-1 株 Ex-2 に含まれる中性糖は 14.19% で、その組成はマンノース 3.23 % (中性糖中 23 %)、グルコース 0.90 % (中性糖中 6 %)、ガラクトース 10.05 % (中性糖中 71 %) であった。

#### 【2'-1\_Ex-3】

Ex-3 に含まれる中性糖は 32.39 % と Ex-2 より多く、その組成はマンノース 5.58 % (中性糖中 17 %)、グルコース 1.13 % (中性糖中 4 %)、ガラクトース 25.67 % (中性糖中 79 %) であり、糖組成は類似していた。

#### 【4B\_CB】

4B 株の CB に含まれる中性糖は 82.71 % と 2'-1 株に比べて多く、糖を主成分としていることが分かった。その組成はキシロース 0.21 % (中性糖中 0.003 %)、マンノース 31.18 % (中性糖中 38 %)、グルコース 13.78 % (中性糖中 17 %)、ガラクトース 37.54 % (中性糖中 45 %) であった。

#### 【4B\_Ex】

4B 株の Ex に含まれる中性糖は 37.92 % であり、その組成はマンノース 25.74 % (中性糖中 68 %)、グルコース 9.28 % (中性糖中 24 %)、ガラクトース 2.9 % (中性糖中 8 %) であった。CB と比較するとガラクトースの含有率が少なく、マンノースを主成分としていた。本研究室では、4B 株のストレス耐性を調べるためにエタノールを 5 % 添加し培地での培養試験を行った。ここで得られた Ex について構成糖分析を行った結果、中性糖の含量は 29.50 % と通常の Ex より少なかったが、その組成はマンノース 17.98 % (中性糖中 61 %)、グルコース 8.96 % (中性糖中 30 %)、ガラクトース 2.56 % (中性糖中 9 %) と通常の Ex の糖組成と類似していた。

### 3.3.2 ウロン酸分析

標準物質としてガラクトuron酸を用いた検量線を Fig.33、Table.17 に示した。各 EPS 試料の重量に対するウロン酸の含有率を Table.20~22 に示した。2'-1 株ではグルコース添加培地の CB の含量は 0.59~7.43%と少なかったが、グルコース無添加培地の CB の含量は 10.17%と 2'-1 株のサンプル中最も多かった。2'-1 株の Ex-1 の含量はグルコース添加培地で 3.97~9.4%、グルコース無添加培地で 6.83%であった。また、Ex-2 の含量は 1.41 %、Ex-3 の含量は 2.88 % であり、Ex-1 に比べて少量であった。

4B 株では CB の含量は 1.85%であった。

### 3.3.3 タンパク質分析

標準物質として BSA を用いて検量線を作成し、サンプルのタンパク質含量を測定した (Fig.34)。サンプルの重量に対するタンパク質の含有率を Table.20~22 に示した。2'-1 株の CB のタンパク質含量は 22.10~50.66%であるのに対し、Ex (限外ろ過後) は 8.05~16.64%と少なかった。4B 株は 0.11%と微量であった。

### 3.3.4 各 EPS 組成の比較と構成多糖の推察

中性糖とウロン酸の含量を合計して 100%で表した円グラフと、サンプルの重量に対する中性糖とウロン酸とタンパク質の含有率を表した棒グラフを Fig.35~43 に示した。

まず、培地へのグルコース添加有無の EPS の組成に与える影響について考察した。4B 株はグルコース無添加培地では EPS を生産しなかったことから 2'-1 株を対象とした。2'-1 株の CB は培地へグルコースを添加しなかった場合、ウロン酸を多く含有していたが、中性糖の組成は近似していた。また、いずれもガラクトースを糖の主成分とすることからガラクトースを主鎖とする多糖であると推察された。2'-1 株の Ex では CB とは逆に、グルコース無添加の場合にウロン酸含量が減少していたが、糖組成は近似していた。糖の主成分としてマンノースとガラクトースを約 1 : 1 の割合で含まれていたため、主要構成糖はグルコマンナンまたはガラクタ

ンである可能性が示唆された<sup>4.9)</sup>。グルコマンナンはグルコースとマンノースが約 2 : 3 の割合で  $\beta$ -1,4 結合した直鎖状の水溶性中性多糖であり、骨格全体にアセチル基が分布している。

次にエタノール沈殿の EPS 組成への影響を調べた。Ex-2 と Ex-3 の組成を比較すると (Fig.39、Fig.40) Ex-3 の方が糖の含量が多く、タンパク質の含量は減っていることがわかり、エタノール沈殿によって糖の回収量は増えるがタンパク質の回収量が増えるわけではないことが分かった。糖組成は同様であることからエタノール沈殿による糖組成への影響は小さいと言える。しかし、限外ろ過前の Ex-1 の組成と比較すると、Ex-2、3 は Ex-1 に比べて中性糖の含量が減り、マンノースの含有率が減少して CB の糖組成に近似することがわかった。このことから、限外ろ過によって除去される 10kDa 以下の糖またはオリゴ糖が主としてマンノースで構成されていることが示唆され、Ex-1 の主要多糖はグルコマンナンではなく、ガラクトースを主成分とすることが示唆された。

4B 株の CB はマンノース、グルコース、ガラクトースを約 4 : 2 : 5 の割合で含み主成分としていた。よって、ガラクトマンナン、グルコマンナン、ガラクトンなどが構成多糖として考えられた<sup>4.8)</sup>。ガラクトマンナンはマンノースからなる直鎖状主鎖に、ガラクトースが  $\alpha$ -1,6 結合した中性多糖である。

4B 株の Ex の組成はマンノース、グルコース、ガラクトースを約 17 : 6 : 2 の割合で含み、マンノースを主成分としていた。よって、主としてグルコマンナンで構成されていることが推察された。また、多くの微生物にとって有害なエタノールを添加した培地では 4B 株は Ex を生産したが CB は回収できなかった。得られた Ex の組成は類似しており、ストレス環境化においても同様の Ex を生産していることが分かった。



### 3.3.5 アミノ酸分析

アミノ酸分析の結果を Fig.44、45 に示した。その結果、2'-1 株の Ex のアミノ酸組成は 80% がグルタミン酸であり、主成分であった。グルタミン酸は近縁種の *Bacillus lichenihormis* の生産するポリグルタミン酸の構成アミノ酸である。4B 株の CB のアミノ酸組成の主成分はシスタチオニンで 65%を占めていた。シスタチオニンのポリマーは現在まで報告されていない。微生物由来のホモアミノポリマーは種々の *Bacillus* 属の生産するポリグルタミン酸(PGA) と *Streptomyces albulus* が生産するポリリシン(PL)しか発見されていない<sup>14,16)</sup>

### 3.4 FT-IR 分析

サンプルの赤外線吸収スペクトルを測定した結果を Fig.46~53 に示した。また、各サンプルのピークとその強度、吸収波長の特徴を Table.24 に示した<sup>7,9,11,12,17,18)</sup>。2'-1 株と 4B 株のすべてのサンプルに共通していたのは、3300 cm<sup>-1</sup>、2930 cm<sup>-1</sup>、1640 cm<sup>-1</sup>、1404 cm<sup>-1</sup>、1020-1070 cm<sup>-1</sup>に吸収極大を持つバンドであった。そのうち 1640 cm<sup>-1</sup>、1404 cm<sup>-1</sup>はタンパク質に特有のバンドであり、2930 cm<sup>-1</sup>、1020-1070 cm<sup>-1</sup>は糖に特徴的なバンドであり、組成分析と一致して糖とタンパク質が混在した物質だと示された。また、これらのバンドの強度を 2 株で比較してみると、糖の含量が多い 4B 株の CB は 2'-1 株に比べて 1020-1070 cm<sup>-1</sup>のバンドの強度が他のバンドに比べても大きく、糖の含量と相関があることが示唆された(Fig.54)。しかし、2'-1 株の Ex-1 は Ex-2、3 に比べて中性糖含量が多いにも関わらず糖特有のバンドの強度は小さかったので糖以外のもの(構造)の違いが影響していると示唆された。

エタノール沈殿による構造への影響を調べるために、Ex-2 と Ex-3 を比較した (Fig.55 A)。Ex-3の方が糖の含量が多かったことを反映して、1020-1070 cm<sup>-1</sup>の吸収がやや大きかったが、スペクトルの形状は同様で、エタノール沈殿による構造への影響も小さいと分かった。Ex-3 で 1550 cm<sup>-1</sup>と 1440 cm<sup>-1</sup>のバンドがやや小さい原因としては、エタノール沈殿によってタンパク質の立体構造が変化した可能性が考えられる。限外ろ過の構造への影響を調べるため Ex-1

と Ex-3 を比較した (Fig.55、B)。先に述べた通り、Ex-1 の  $1020\text{-}1070\text{ cm}^{-1}$  の吸収が小さい原因は不明であったが、そのほかにも  $1550\text{ cm}^{-1}$ 、 $1440\text{ cm}^{-1}$ 、 $1225\text{ cm}^{-1}$  の吸収バンドの形状に違いが見られた。ここで組成が近似していた Ex-3 と CB のスペクトルを比較すると、 $1640\text{-}1220\text{ cm}^{-1}$  の形状がほぼ一致していた (Fig.55 C)。このことから、限外ろ過によってマンノースを主成分とする糖またはオリゴ糖が除去されたことが原因と考えられた。また、Ex と CB は同様の主要構成多糖をもつと考えられた。

4B 株の CB と Ex を比較すると  $2930\text{ cm}^{-1}$ 、 $1404\text{ cm}^{-1}$ 、 $1020\text{-}1070\text{ cm}^{-1}$  は糖に特徴的なバンドの形状に違いが見られ、糖組成の違いと主要構成多糖の違いが反映されたと考えられた。また、異なる培地由来の EPS で違いはほぼ見られなかったことから、同様の EPS を生産していると考えられた。

### 3.5 分子量測定

スタンダードとしてプルランを用い、GPC によるサンプルの分子量を測定した結果を Fig.56~62 に示した。その結果、2 株の EPS は重量分子量  $1.0 \times 10^7$  以上の超高分子物質であることが分かった。しかし、2 株の EPS はいずれも水に難溶で、溶け残る部分もあったことから濃度の調製や粘度の調製が困難でサンプルごとに分子量に差が出たと考えられた。また、各 EPS の GPC プロファイルに複数のピークが見られ、これらが複数の高分子を含むことが明らかになった。そのため、4B 株の CB-2 をカラムクロマトグラフィーにて分離精製を行うこととした。

### 3.6 イオン交換クロマトグラフィー

陰イオン交換樹脂にてサンプルの分離を行った<sup>11)</sup>。得られた各画フラクションの全糖量をフェノール硫酸法にて測定した結果を Fig.63 に示した。スタンダードとしてグルコースを用いて作成した検量線から全糖量を測定した (Fig.64、Table.32)。Fig.63 より、全糖量の多かった⑤と⑮のサンプルのうち 50 本目と 149 本目のフラクションの溶液を GPC 分析に供して分子量を測定した (Fig.66、67)。その結果、プロファイルのピークが減少していることから、単一物質として回収できることが分かった。しかし、⑮以降の塩濃度での分離とフラクションの回収を行っていないため、詳細な組成分析と構造解析のために今後もクロマトグラフィーによる分離・精製が必要である。

## 第4章 総括

(独)海洋研究開発機構と信州大学との共同研究により、これまで研究例の少ない深海から新規に EPS 生産菌は 2 株分離された。本研究室で 2 株の性状や EPS 生産について研究を進めている。本論文では 2 株の至適培養条件と生産された EPS の組成と化学構造の特徴、また相関を明らかにすることを目的とした。

2'-1 株、4B 株両方ともグルコースを炭素源として  $1.0 \times 10^7$  以上の非常に分子量の高い EPS を生産する事が分かった。2'-1 株についてはグルコースを添加しない培地でも EPS を生産することが、4B 株については炭素源としてグルコースを必須とすることが分かった。また、菌株によって菌体付着型 EPS すなわち CB 生産のための最適培地は異なり、2'-1 株では二層培地にて、4B 株では液体培地にてその収量が最大となった。各 EPS の組成分析の結果、糖組成、ウロン酸含量、タンパク質含量、アミノ酸組成が明らかになり、FT-IR 分析から EPS の組成と構造に相関があることが確認できた。2'-1 株の CB は糖とタンパク質をほぼ 1 : 1 で含有し、ガラクトランを主要構成多糖とすると考えられた。Ex は半分以上が糖であり、CB 同様にガラクトランを主要構成多糖とし、さらにマンノースを主成分とする 10kDa 以下の糖またはオリゴ糖で構成されると推察された。また、Ex のアミノ酸組成はグルタミン酸を主成分とし、近縁種の *Bacillus lichenihormis* と同様にポリグルタミン酸を生産している可能性が示唆された。また、Ex については限外ろ過前後の糖組成の変化から、10kDa 以下の構成成分と 10kDa 以上の構成成分の組成と多糖体の推察が可能になった。エタノール沈殿による EPS の組成と構造への影響は小さく、より効率的に糖成分を回収できることが分かった。

4B 株の CB は 8 割が糖で構成され、その組成から、ガラクトマンナン、グルコマンナン、ガラクトランなどが構成多糖として考えられた。また、2'-1 株とは違い、Ex は CB と比較すると糖組成や FT-IR スペクトルに違いが見られた。Ex の糖の含量は 4 割でマンノースを主成分とし、グルコースとガラクトースを含有することからグルコマンナンを主要構成多糖とすることが推察された。また、アミノ酸分析の結果、シスタチオニンを主成分とすることが分かった。

GPC プロファイルから各 EPS は複数の高分子から構成されることが明らかになったため、4B 株 CB-2 について陰イオンクロマトグラフィーによる分離・精製を試みた。その結果、単一のピークを持つフラクションが得られ、陰イオンクロマトグラフィーによって単一物質として回収できることが分かった。分離条件を検討することで、含有する全ての高分子を単一物質として回収し、詳細な組成を明らかにすることが可能と考えられる。

今後は、より詳細な組成分析と、糖鎖分析や NMR 等による化学構造解析が必要と考えられる。

## 謝辞

本研究の遂行ならびに本論文の執筆に際してご指導賜りました、東京海洋大学 海洋科学部の榎牧子助教に厚く御礼申し上げます。

本研究および本論文の遂行にあたり、多大なるご助言とご指導を賜りました東京海洋大学 海洋科学部の浦野直人教授、石田真巳准教授に心より御礼申し上げます。

また、本研究の遂行に際して多大なるご指導賜りました(独)海洋研究開発機構の加藤千明博士、信州大学 繊維学部の山中茂教授、伊藤吹夕助教に厚く御礼申し上げます。

本研究を進めるにあたって、貴重なご助言を数多く賜りました、日本水産株式会社の関口峻允研究員に厚く御礼申し上げます。

本研究に関して、多くの協力を頂いた東京海洋大学機能材料化学研究室の皆様、および(独)海洋研究開発機構 極限環境生物圏領域 海洋生物多様性研究プログラムの皆様に心より感謝申し上げます。

## 参考文献

- 1) 関口峻允. 深海環境における生分解性プラスチックの分解および分解微生物に関する研究. 2010.
- 2) 加藤千明、高井研. 深海極限世界の微生物 - 好圧菌・超高熱菌から海底地殻内微生物へ - 宇宙生物科学 14, pp.341-350. 2000.
- 3) C.A.Mancuso Nichols,J.Guesennec,J.P.Bowman. Bacterial Exopolysaccharides from Extreme Marine Environments with Special Consideration of the Southern Ocean,Sea ice,and Deep-sea Hydrothermal Vents. pp.253-271. 2005.
- 4) 國崎直道、佐野征男. 食品多糖類.幸書房.2001.
- 5) 竹内曜. 深海から分離されたポリマー生産菌に関する培養条件の検討. 2010.
- 6) 坂本詩織. 深海から分離した細胞外高分子物質生産微生物の特徴.2011
- 7) Roberta Fusconi,Ronasa Maria Nascimento Assuncao,Renata de Moura Guimaraes, Guimes Rodrigues Filho,Antonio Eduardo da Hora Machado. Exopolysaccharide produced by *Gordonia polyisoprenivorans* CCT 7137 in GYM commercial medium and sugarcane malasses alternative medium: FT-IR study and emulsifying activity. pp.403-408. 2009.
- 8) 宮本武明、赤池敏宏、西成勝好. 天然・生体高分子材料の新展開.シーエムシー出版. 2003
- 9) 泉美治ら. 機器分析のてびき - IR、MNR、MS、UV-.化学同人. 1996.
- 10) Yan-Qun Li,Lu Fang,Ke-Chang Zhang. Structure and bioactivities of galactose rich extracellular polysaccharide from submergedly cultured *Ganoderma lucidum*. pp.323-328. 2007.
- 11) 島内武彦. 赤外線吸収スペクトル解析法.南江堂.1967.
- 12) 岡田恵次、小寄正敏 訳. 有機化合物のスペクトル解析入門-UV、IR、NMR、MS-.

化学同人.1999.

- 13) 御園生誠、村橋俊一. グリーンケミストリー 持続的社会的のための化学.講談社サイエ  
ンティフィク.2003.
- 14) 村井澤夫、荒井基夫. 応用微生物学 改訂版.培風館.2009.
- 15) 宮下徳治ら.ライフサイエンス系の高分子化学.三協出版. 2004.
- 16) 土肥義治ら. 生分解性プラスチックハンドブック ; エヌティーエス.1996.
- 17) Christophe Gainie,Tatiana Gorner,Bruno S.Lartiges,Sandra Abdelouhab, Philippe  
de Donato. Characterization of activated sludge exopolymers from various origins : A  
combined size-exclusion chromatography and infrared microscopy study.  
pp.3044-4054. 2005.
- 18) Vidya Prabhakar Kodali,Subbasich Das,Ramkrishna Sen. An Exopolysaccharide  
from a probiotic: Biosynthesis dynamics, composition and emulsifying activity.  
pp.695-699.2009.



# 图表



Fig.1 (独)海洋研究開発気候所有のハイパードルフィン



Fig.2 ハイパードルフィンによるサンプル採取

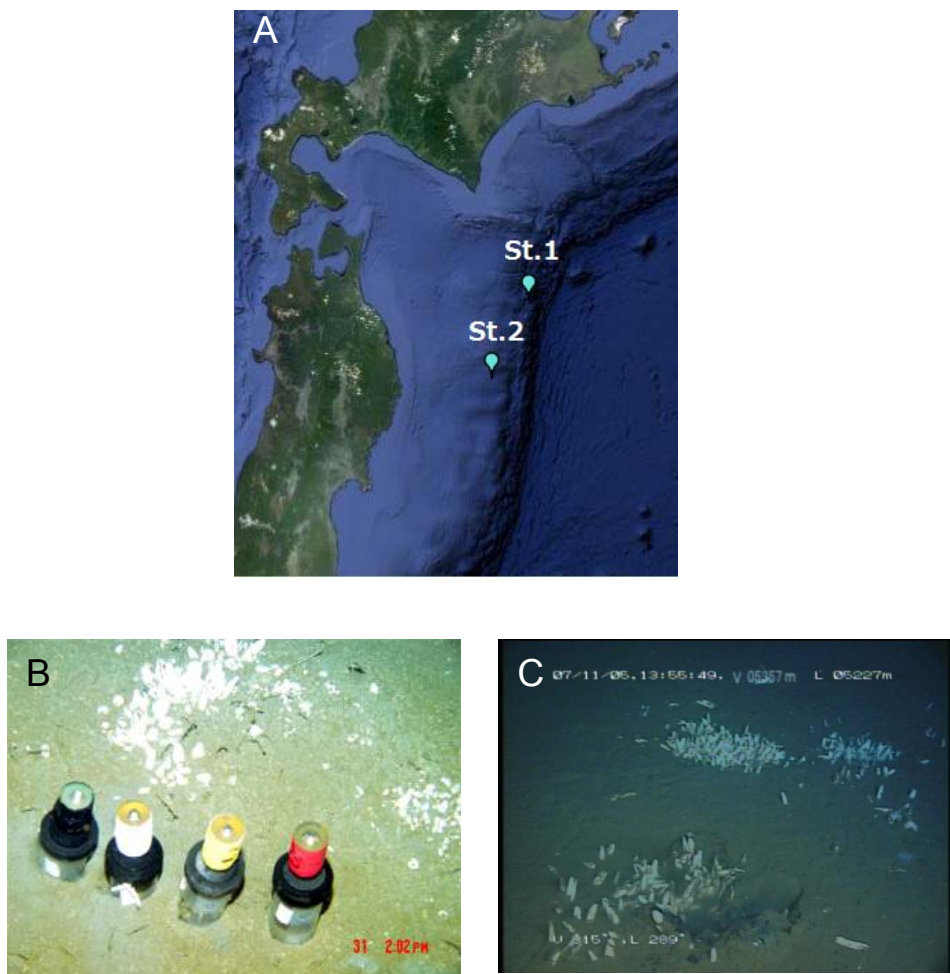


Fig.3 A: サンプル採取地点 B: St.1 シロウリガイ群集 C: St.2 シロウリガイ群集

Table.1 サンプル採取地点

Station	Depth	Location	SapleID
St.1	6181m	40° 6.045'N 144° 10.9971'E	6K#950Cw
St.2	5347m	39° 6.3295'N 143° 53.563'E	6K#1160

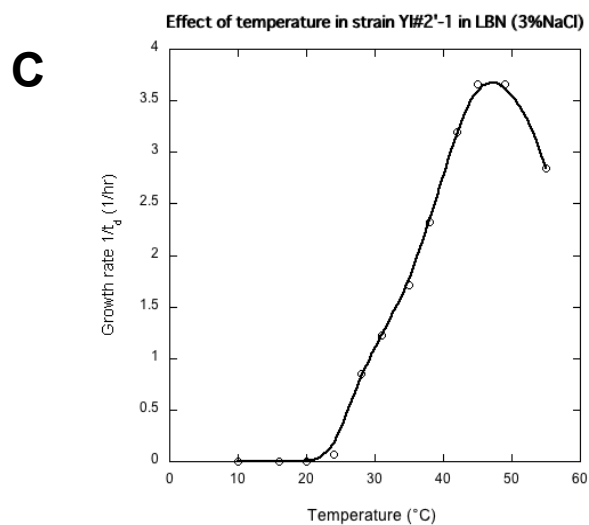
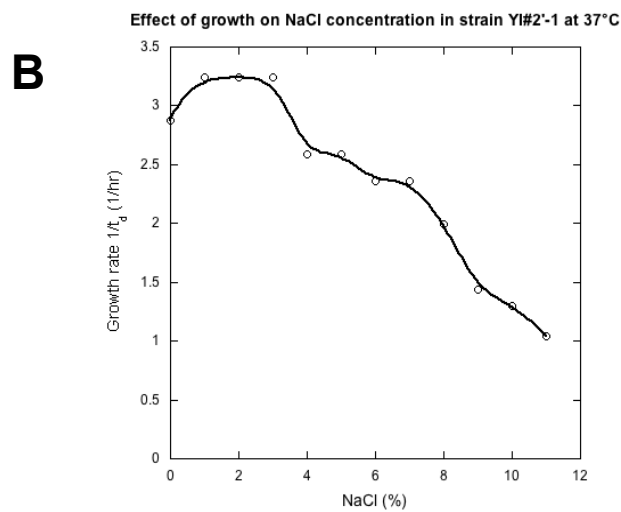
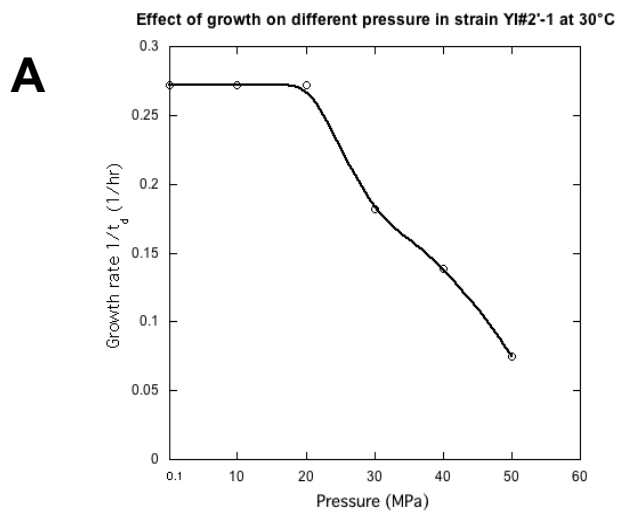


Fig. 4 A: 2'-1株の至適増殖圧力(30°C)  
 B: 2'-1株の至適増殖塩濃度(37°C) C: 2'-1株の至適増殖温度(3 % NaCl)

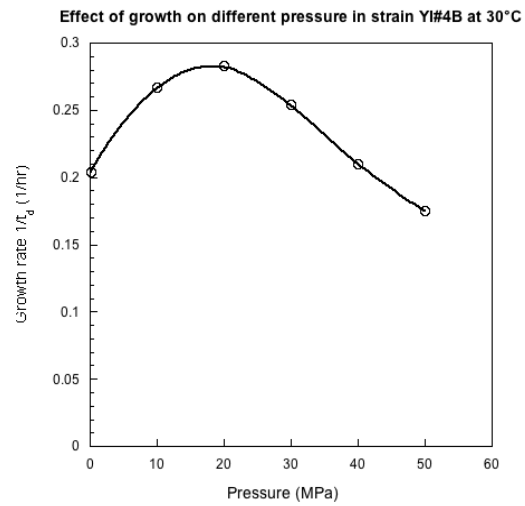
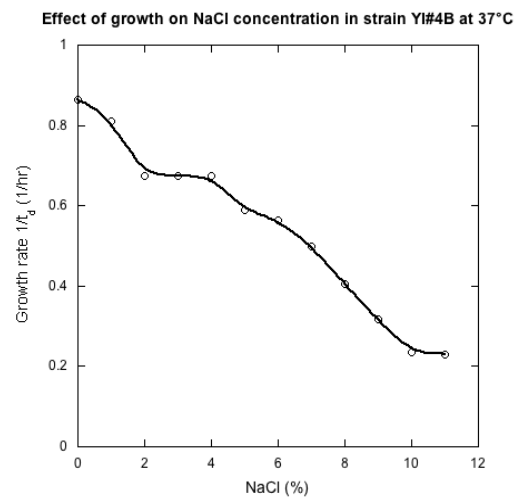
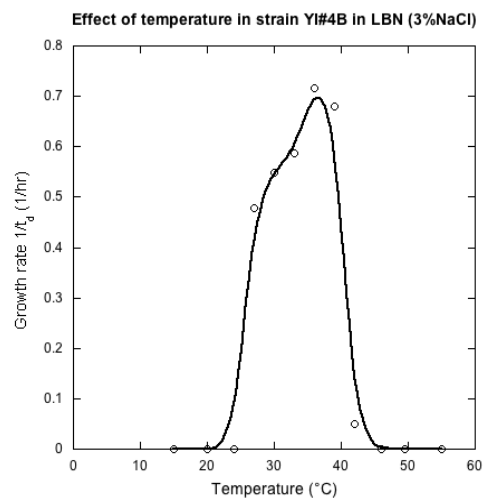
**A****B****C**

Fig. 5 A: 4B株の至適増殖圧力(30°C)

B: 4B株の至適増殖塩濃度(37°C) C: 4B株の至適増殖温度(3 % NaCl)

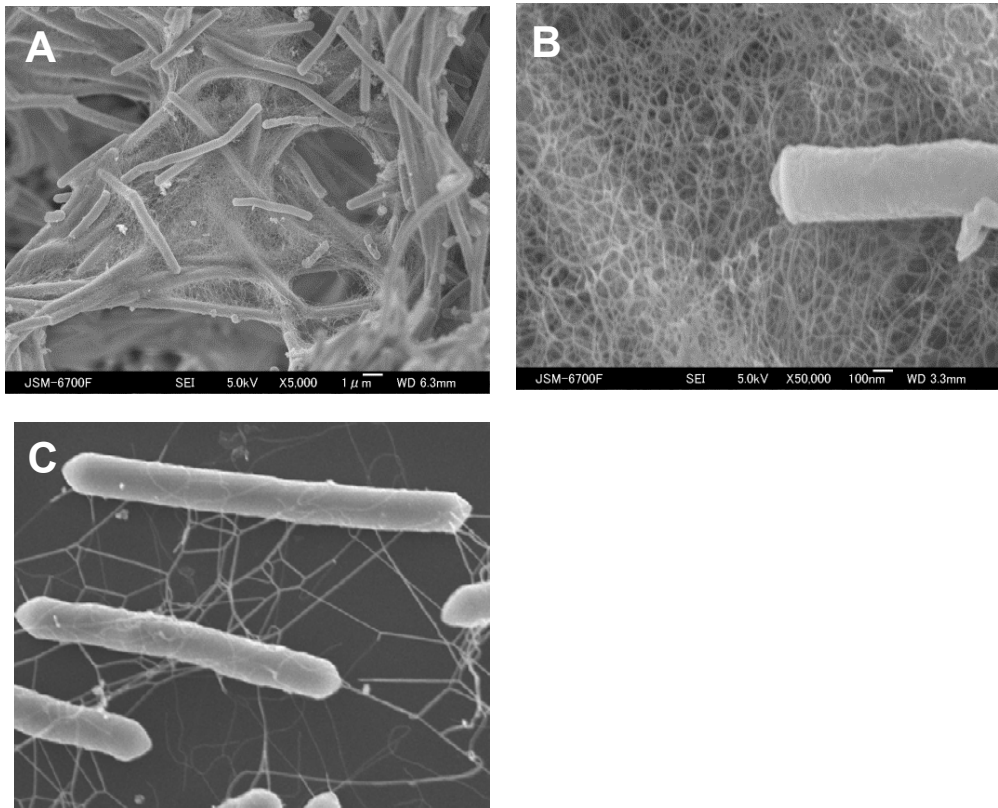


Fig.6 2'-1株のSEM画像

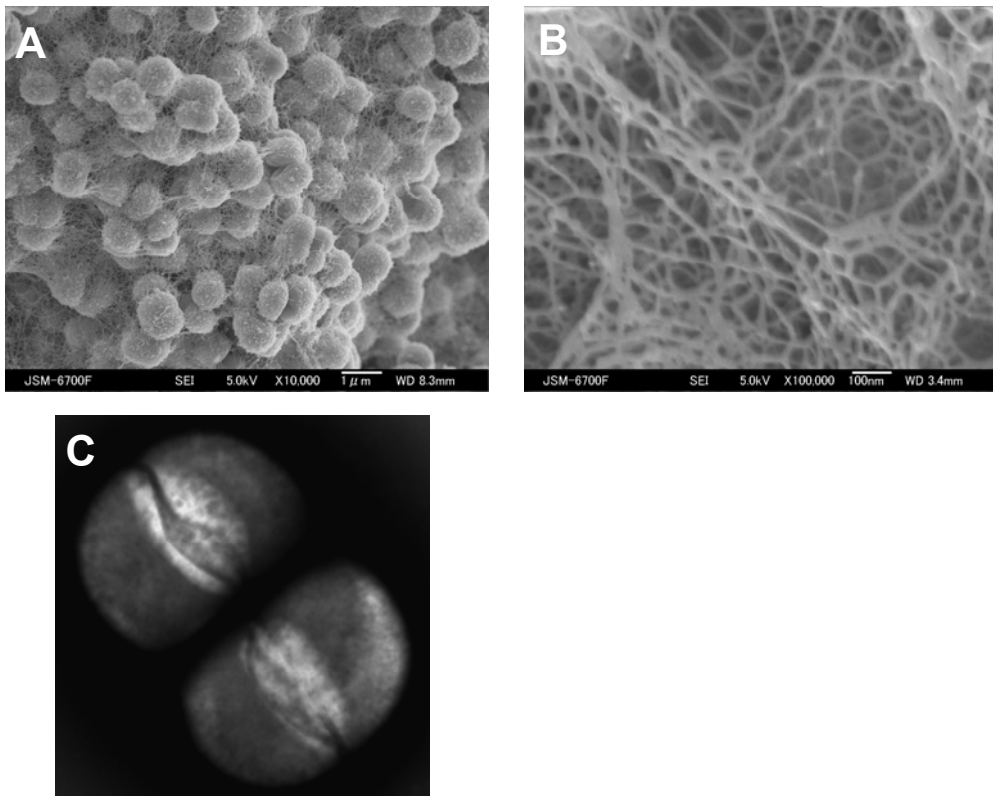


Fig.7 A , B : 4B株のSEM画像 C : 4B株のTEM画像

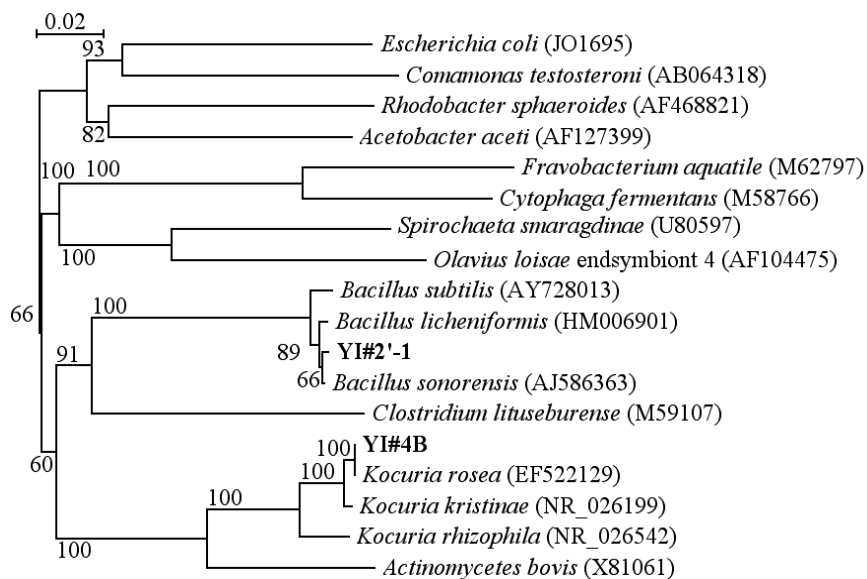


Fig. 8 系統樹


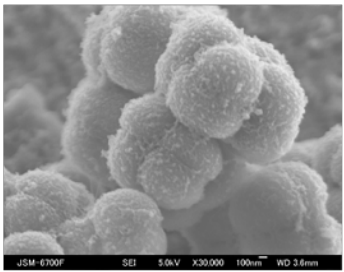
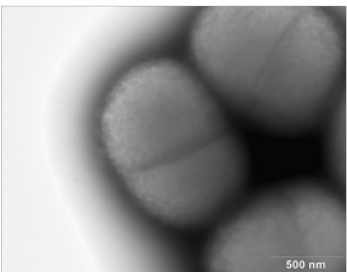
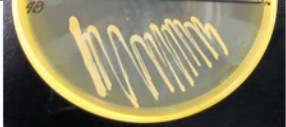
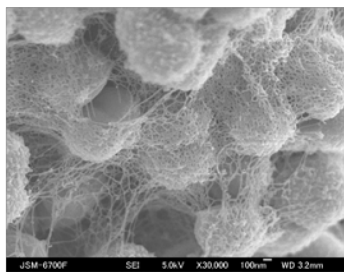
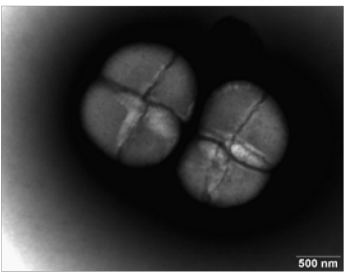
	培地の様子	SEM	TEM
<i>Kocuria.rosea</i>			
4B			

Fig. 9 *Kocuria.rosea*と4B株の違い

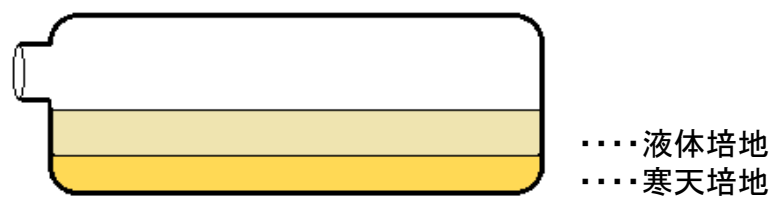


Fig.10 2'-1株の二層培地

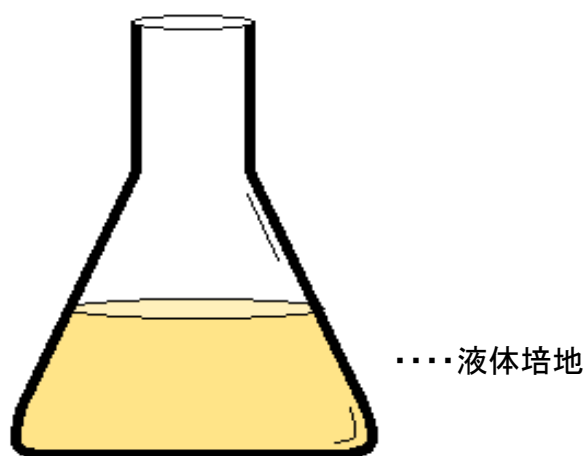


Fig.11 4B株の液体培地



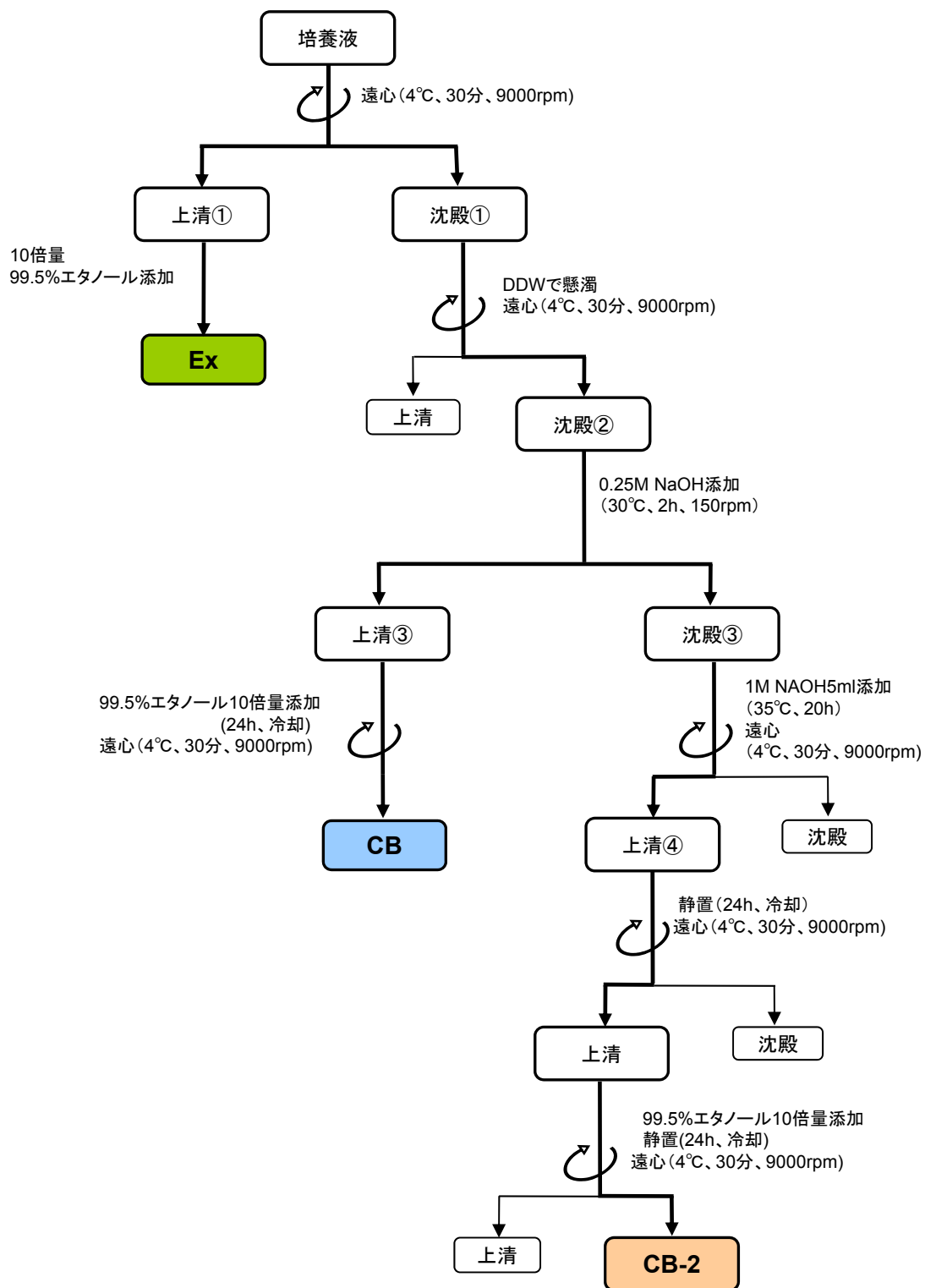


Fig.12 生産物回収のフロー

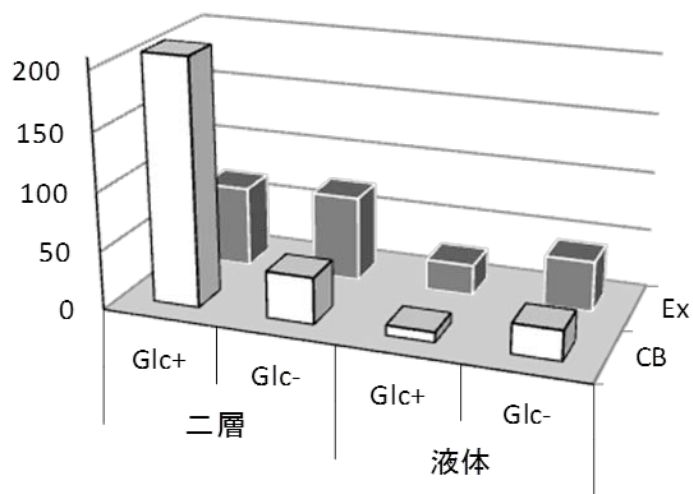


Fig.13 培地異なる2'-1株の生産物の回収量

Table.10 培地組成と回収量

培地	Glc有無	回収量 (dry mg)		
		CB	Ex	総量
固液二層	+	209.9	69.1	279
	-	39.9	72.6	112.5
液体	+	8.6	26.1	34.7
	-	25.6	42.8	68.4

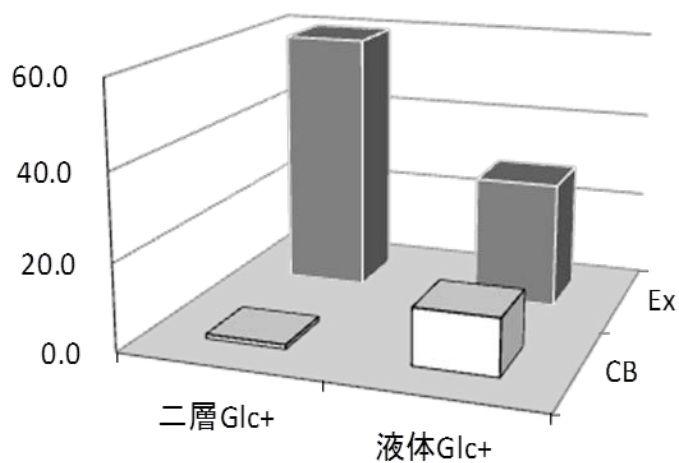


Fig.14 培地異なる4B株の生産物の回収量

Table.11 培地組成と回収量

培地	Glc有無	回収量 (dry mg)		
		CB	Ex	総量
固液二層	+	1	60.5	61.5
液体	+	13	28.9	41.9

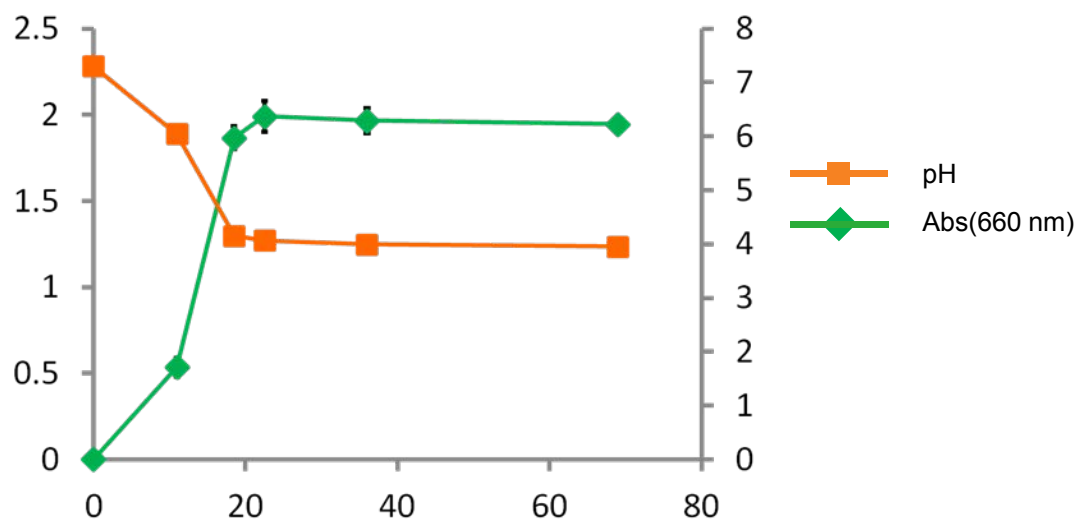


Fig. 15 4B株培地のAbsとpHの経時変化

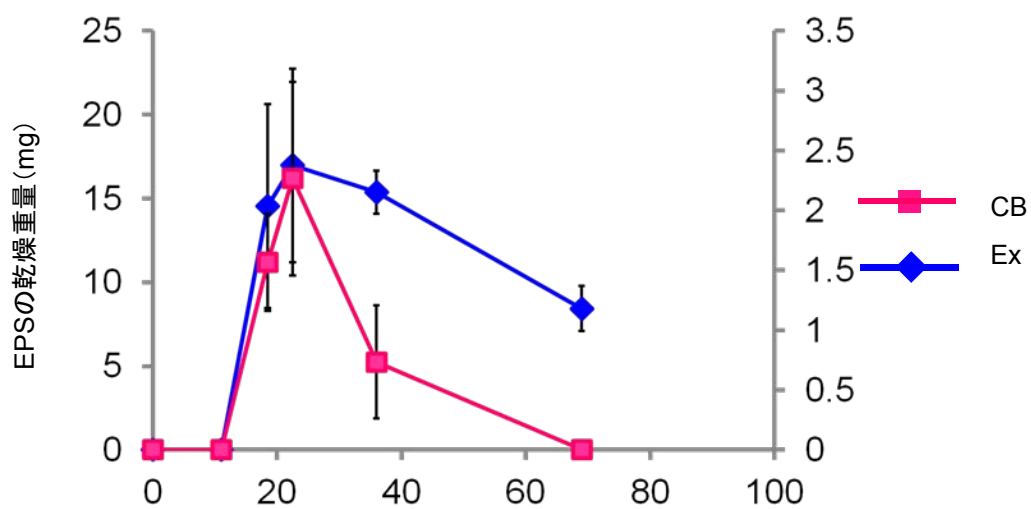


Fig. 16 4B株のEPSの回収量の経時変化



Fig.17 2'-1株のCB

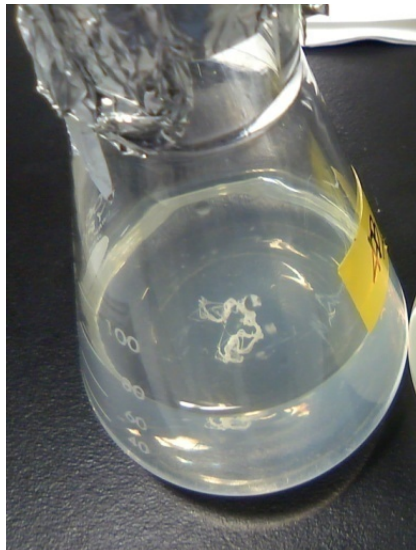


Fig.18 4B株のCB

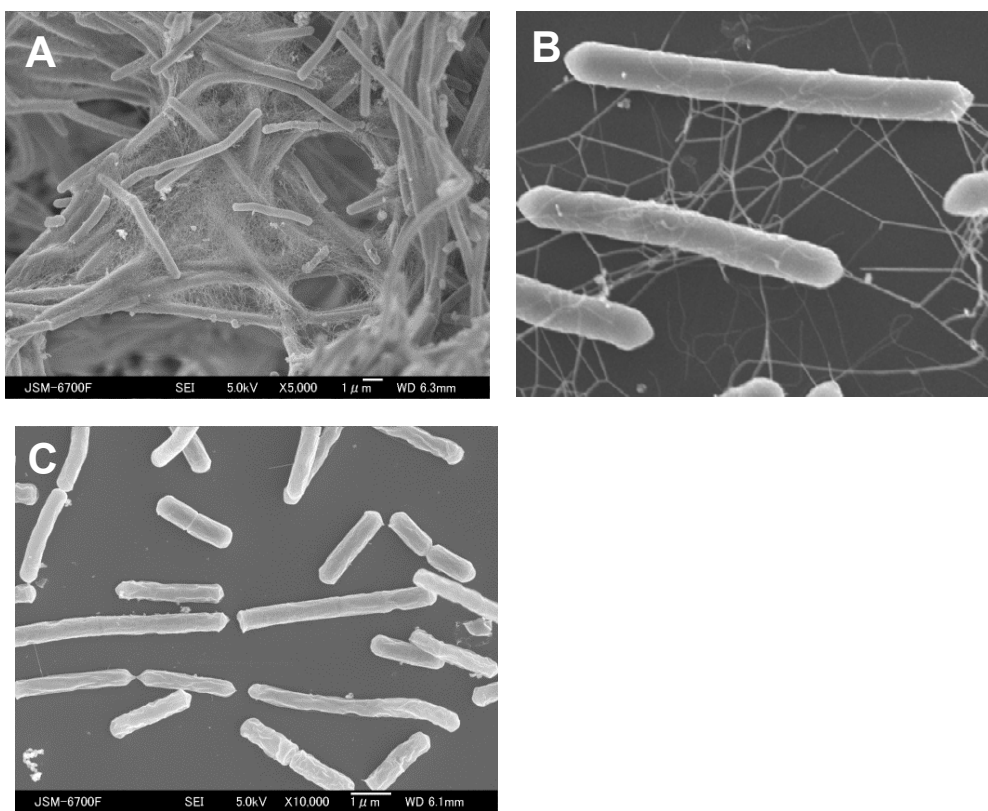


Fig.19 A, B, 2'-1株のSEM画像 C:アルカリ処理後の2'-1株のSEM画像

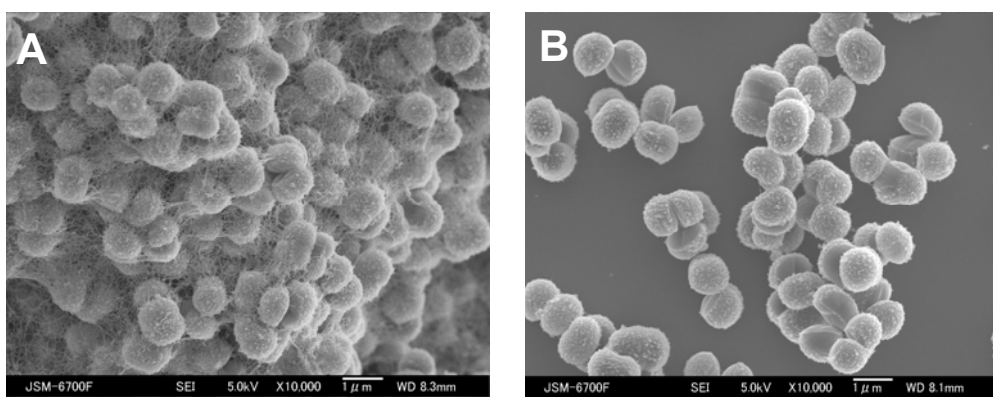


Fig.20 A : 4B株のSEM画像 B : アルカリ処理後の4B株のSEM画像

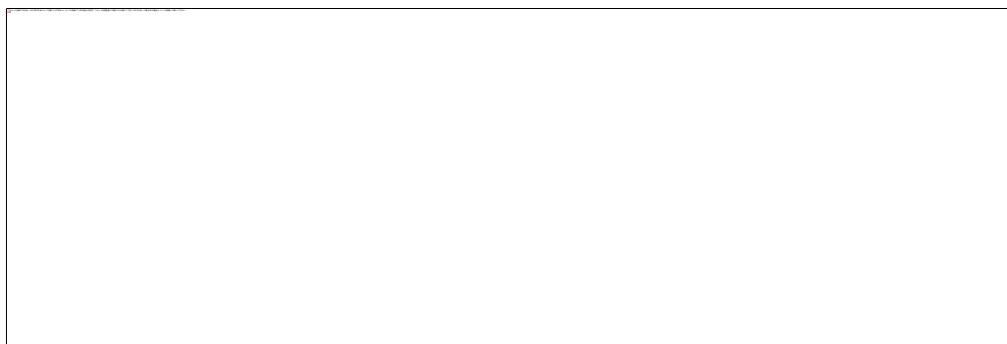


Fig.21 検量線Aのクロマトグラフ

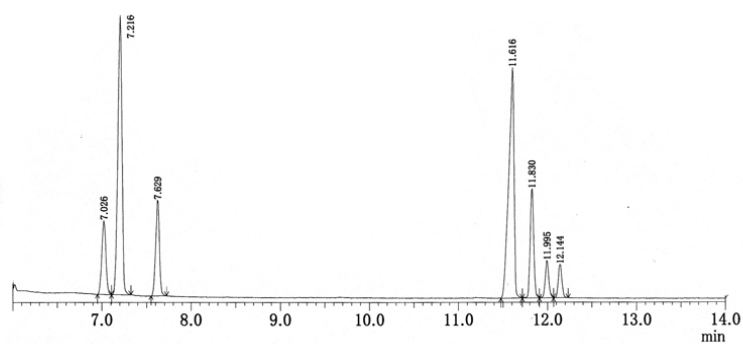


Fig.22 検量線Bのクロマトグラフ

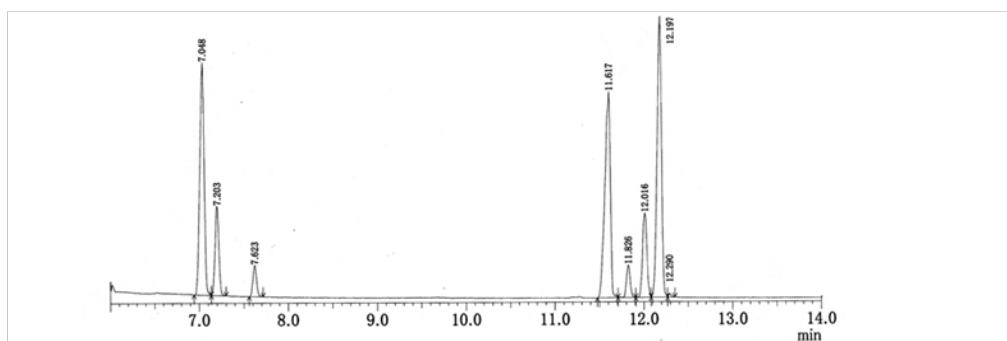


Fig.23 検量線Cのクロマトグラフ

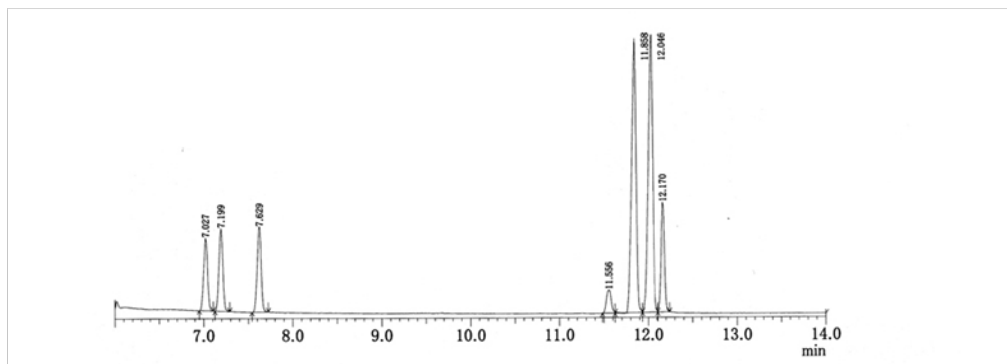


Fig.24 検量線Dのクロマトグラフ

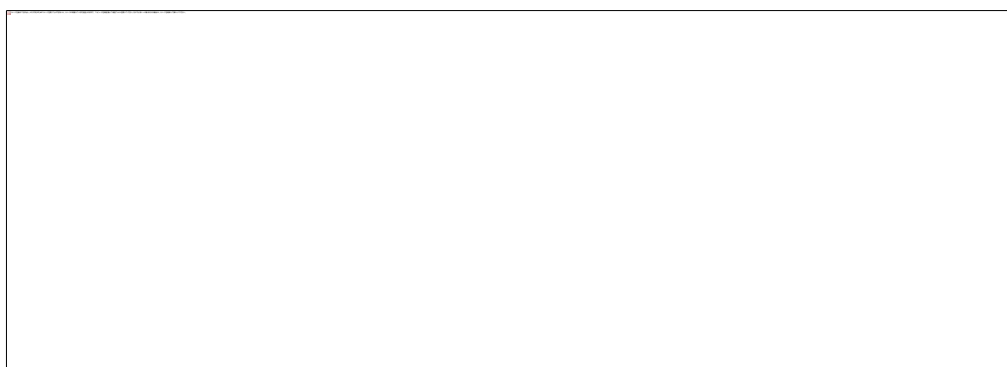


Fig.25 検量線Eのクロマトグラフ

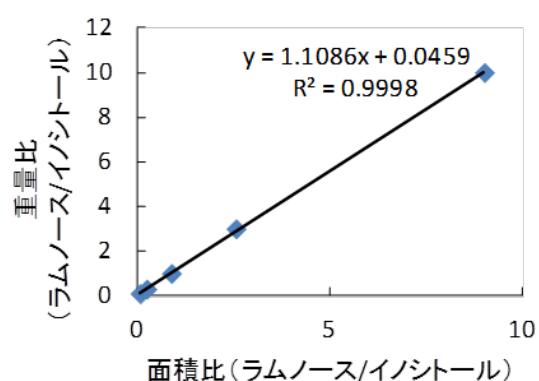


Fig.26 ラムノース検量線

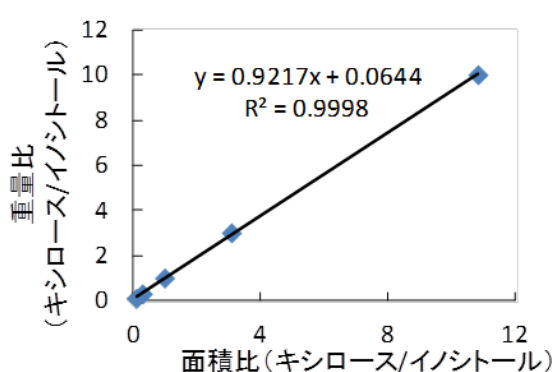


Fig.27 キシロース検量線

Table.12 ラムノースピーク面積

	A	B	C	D	E
ラムノース濃度 (mg/ml)	10.01	10.01	10.01	10.01	10.01
液量 (μl)	10	30	100	30	100
重量 (mg)	0.1001	0.3003	1.001	0.3003	1.001
イノシトール濃度 (mg/ml)	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00
液量 (μl)	100	100	100	10	10
重量 (mg)	1	1	1	0.1	0.1
重量比	0.1001	0.3003	1.001	3.003	10.01
ラムノース ピーク面積	1947754	6066264	20633382	6209714	21941781
イノシトール ピーク面積	24317034	24391401	23230461	2421235	2434185
面積比	0.080098338	0.248705025	0.888203725	2.564688682	9.014015369

Table.13 キシロースピーク面積

	A	B	C	D	E
キシロース濃度 (mg/ml)	10.01	10.01	10.01	10.01	10.01
液量 (μl)	100	30	10	30	100
重量 (mg)	1.001	0.3003	0.1001	0.3003	1.001
イノシトール濃度 (mg/ml)	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00
液量 (μl)	100	100	100	10	10
重量 (mg)	1	1	1	0.1	0.1
重量比	1.001	0.3003	0.1001	3.003	10.01
キシロース ピーク面積	24039572	7156072	2345703	7472968	26340534
イノシトール ピーク面積	24317034	24391401	23230461	2421235	2434185
面積比	0.988589809	0.293385034	0.10097531	3.086428207	10.8210896



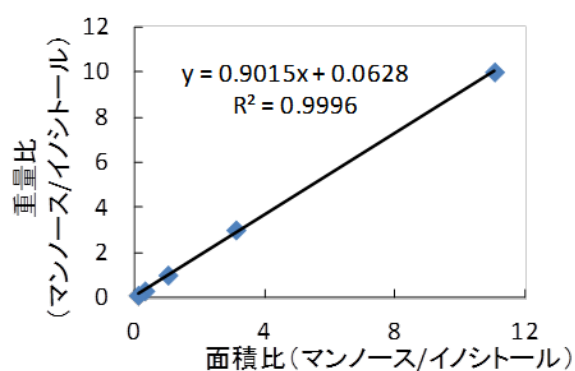


Fig.28 マンノース検量線

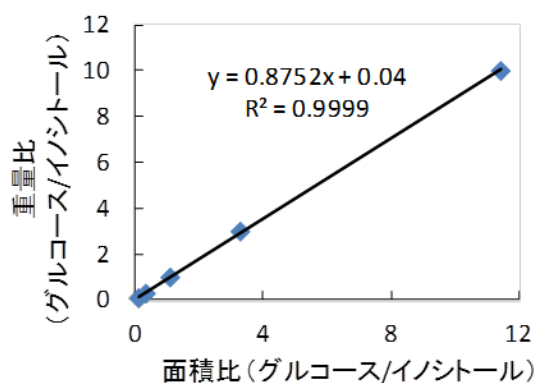


Fig.29 グルコース検量線

Table.14 マンノースピーク面積

	A	B	C	D	E
マンノース濃度 (mg/ml)	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00
液量 (μl)	100	30	10	100	30
重量 (mg)	1	0.3	0.1	1	0.3
イノシトール濃度 (mg/ml)	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00
液量 (μl)	100	100	100	10	10
重量 (mg)	1	1	1	0.1	0.1
重量比	1	0.3	0.1	10	3
マンノース ピーク面積	24928496	7725267	2467414	26784115	7579956
イノシトール ピーク面積	24317034	24391401	23230461	2421235	2434185
面積比	1.025145419	0.316720921	0.106214595	11.06217075	3.113960525

Table.15 グルコースピーク面積

	A	B	C	D	E
グルコース濃度 (mg/ml)	10.01	10.01	10.01	10.01	10.01
液量 (μl)	100	10	30	100	30
重量 (mg)	1.001	0.1001	0.3003	1.001	0.3003
イノシトール濃度 (mg/ml)	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00
液量 (μl)	100	100	100	10	10
重量 (mg)	1	1	1	0.1	0.1
重量比	1.001	0.1001	0.3003	10.01	3.003
グルコース ピーク面積	26594044	2646470	7746356	27649421	8000686
イノシトール ピーク面積	24317034	24391401	23230461	2421235	2434185
面積比	1.093638476	0.108500123	0.333456835	11.41955283	3.28680277

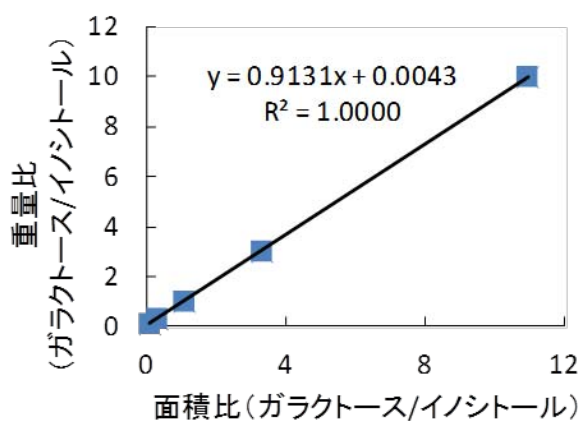


Fig.30 ガラクトース検量線

Table.16 ガラクトースピーク面積

	A	B	C	D	E
ガラクトース濃度 (mg/ml)	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00
液量 (ml)	30	10	100	30	100
重量 (mg)	0.3	0.1	1	0.3	1
イノシトール濃度 (mg/ml)	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00
液量 (ml)	100	100	100	10	10
重量 (mg)	1	1	1	0.1	0.1
重量比	0.3	0.1	1	3	10
ガラクトース ピーク面積	7548528	2437679	25362650	8028582	26622116
イノシトール ピーク面積	24317034	24391401	23230461	2421235	2434185
面積比	0.310421411	0.099940098	1.091784188	3.315903661	10.93676775

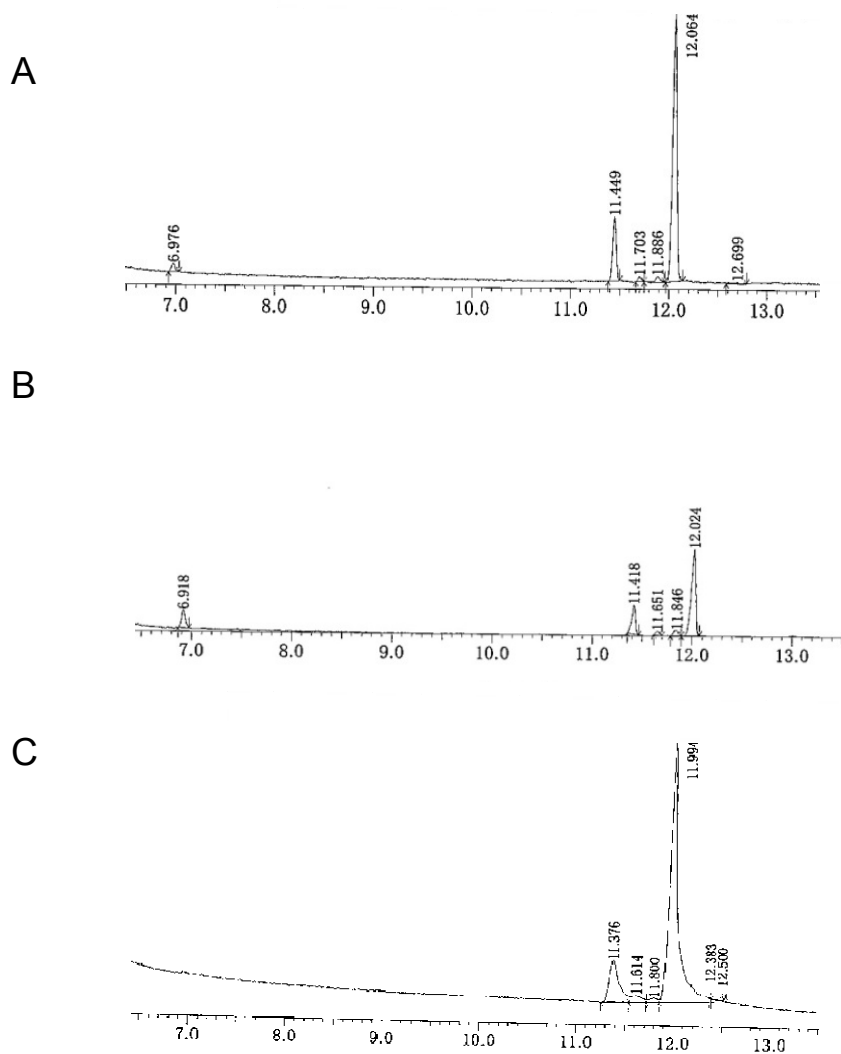


Fig.29 グルコース添加培地で培養した2'-1株のCBのクロマトグラフ  
A: 2.18 sample B: 5.14 sample C: 6.1 sample

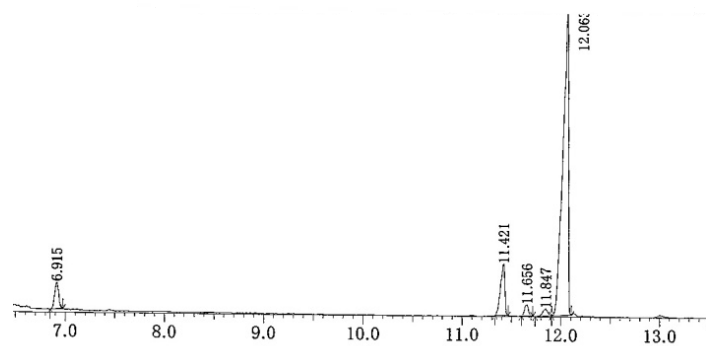
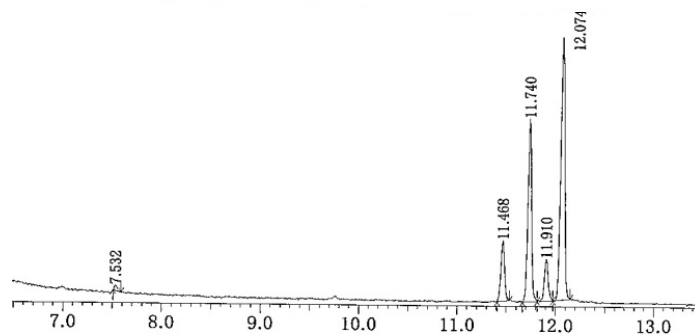
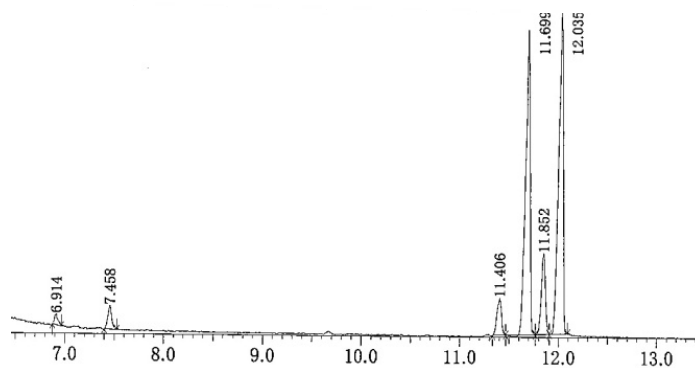


Fig.31 グルコース無添加培地で培養した2'-1株のCBのクロマトグラフ

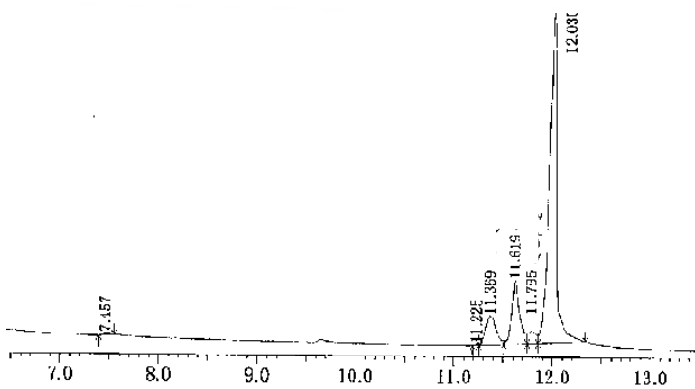
A



B



C



D

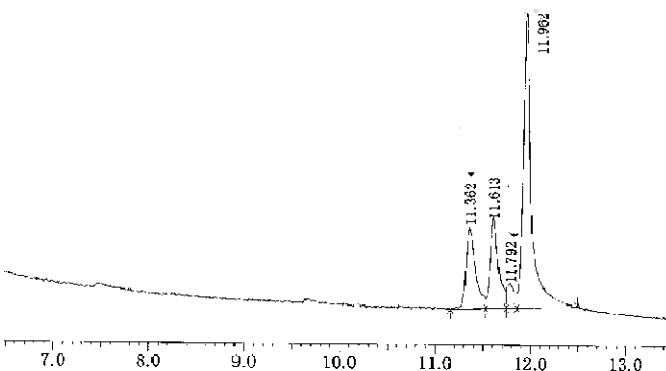


Fig.32 グルコース無添加培地で培養した2'-1株のExのクロマトグラフ

A: 2.18sample B: 5.14sample C: 限外濾過後エタノール沈殿 D: 限外濾過後エタノール沈殿無

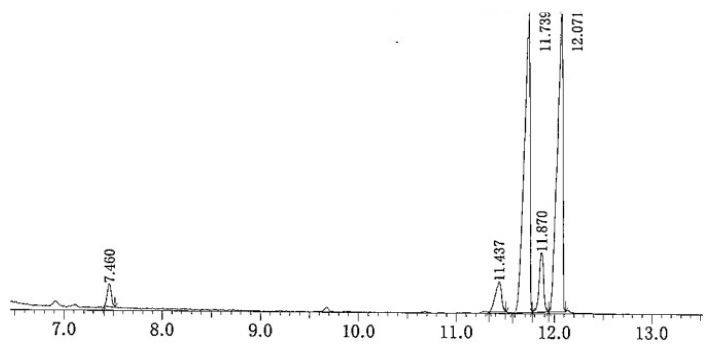


Fig.33 グルコース無添加培地で培養した2'-1株のExのクロマトグラフ

A

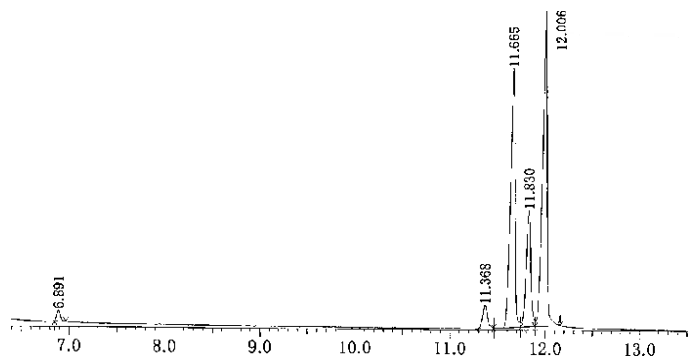


Fig.34 4B株のCBのクロマトグラフ

B

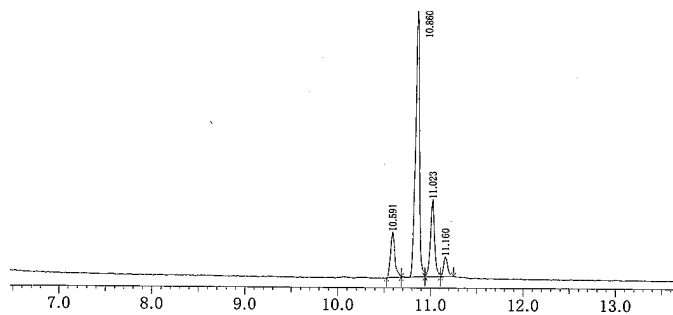


Fig.35 4B株のExのクロマトグラフ

C

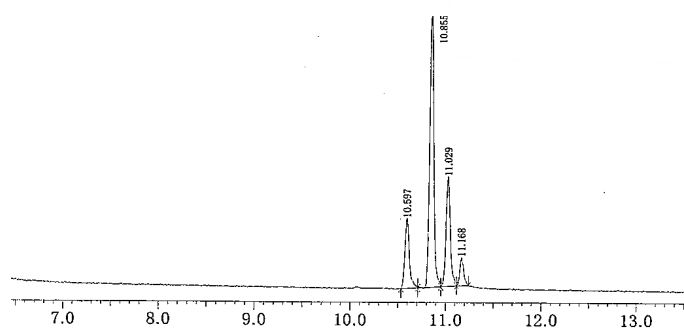


Fig.33 エタノール添加培地で培養した4B株のExのクロマトグラフ

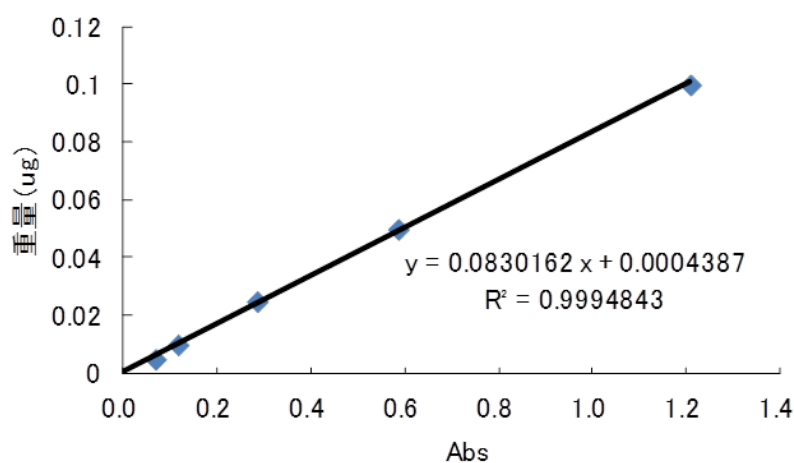


Fig.33 ガラクトツロン酸の検量線

Table.17 ガラクトツロン酸の水溶液濃度と吸光度

重量濃度 (mg/ml)	0	0.005	0.01	0.025	0.05	0.1
重量 (ug)	0	1	2	5	10	20
Abs (520nm) ①	0.012	0.093	0.115	0.268	0.622	1.254
②	0.011	0.068	0.126	0.303	0.572	1.155
③	0.012	0.075	0.140	0.316	0.595	1.250
平均値	0.012	0.079	0.127	0.296	0.596	1.220
-ブランク	0.000	0.067	0.115	0.284	0.584	1.208

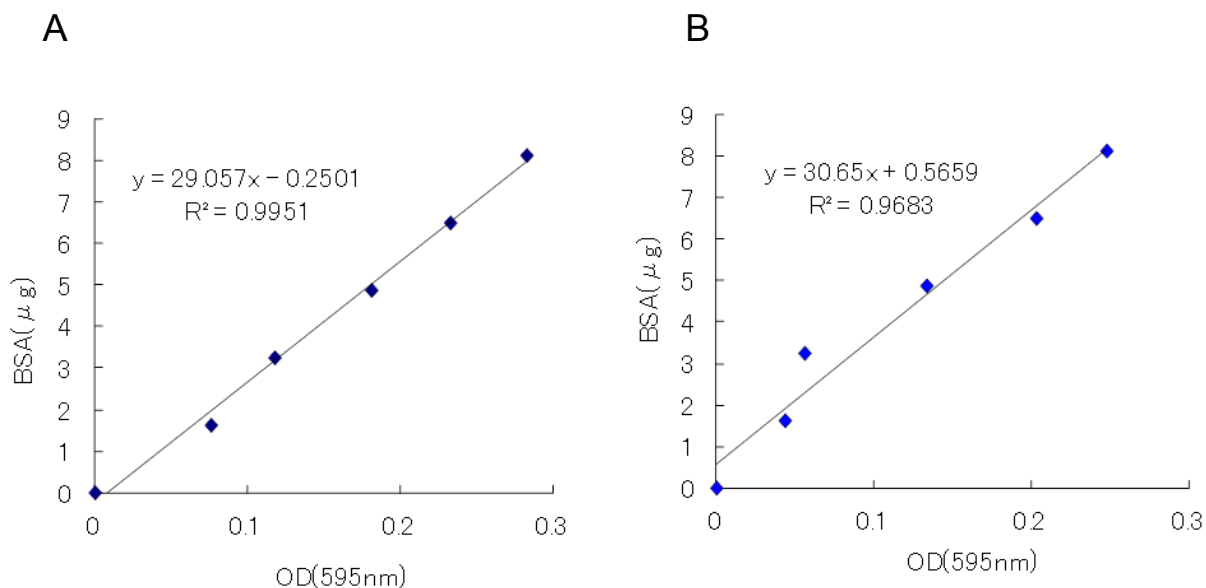


Fig.34 BSAの検量線(A:2010.9.29測定 B:2010.11.1測定)

Table.18 BSAの検量線(2010.9.29)

サンプル	1	2	3	4	5	6
Abs(595nm) ①	0.621	0.709	0.749	0.807	0.862	0.908
②	0.626	0.7	0.735	0.797	0.861	0.893
③	0.624	0.69	0.74	0.81	0.846	0.918
平均	0.624	0.700	0.741	0.805	0.856	0.906
-ブランク	0	0.076	0.118	0.181	0.233	0.283

Table.19 BSAの検量線(2010.11.1)

サンプル	1	2	3	4	5	6
Abs(595nm) ①	0.813		0.805	0.89	0.955	1.022
②		0.814		0.859	0.956	0.993
③	0.700	0.786	0.820	0.921	0.968	0.998
平均	0.757	0.800	0.813	0.890	0.960	1.004
-ブランク	0	0.044	0.056	0.134	0.203	0.248

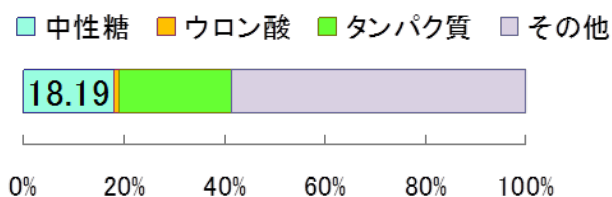
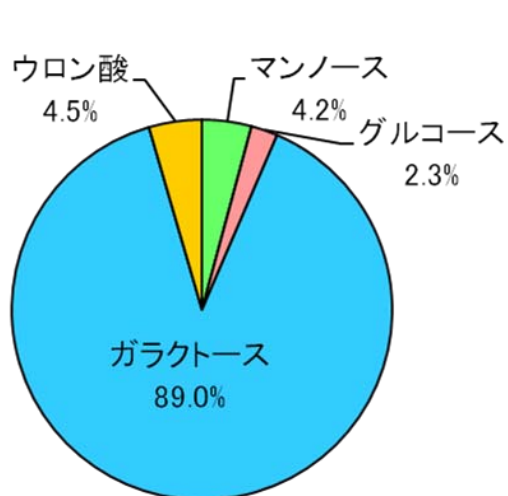


Fig.35 2'-1のCBの組成割合(グルコース添加培地)  
上:糖組成 下:全体の組成

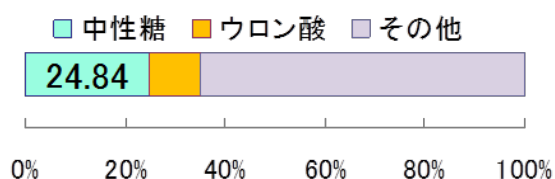
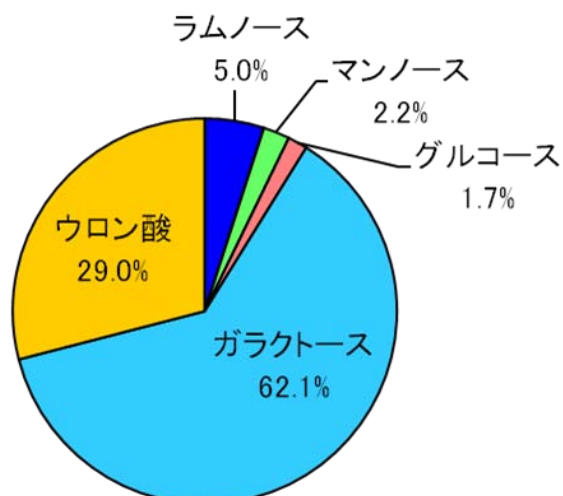


Fig.36 2'-1のCBの組成割合(グルコース無添加培地)  
上:糖組成 下:全体の組成

Table.20 2'-1のCBの組成割合

	ラムノース	キシロース	マンノース	グルコース	ガラクトース	ウロン酸	タンパク質	その他
グルコース添加培地	0.0000	0.0000	0.7990	0.4312	16.9588	0.8570	20.1158	60.8381
グルコース無添加培地	1.7391	0.0000	0.7770	0.5779	21.7491	10.1646	—	60.8381



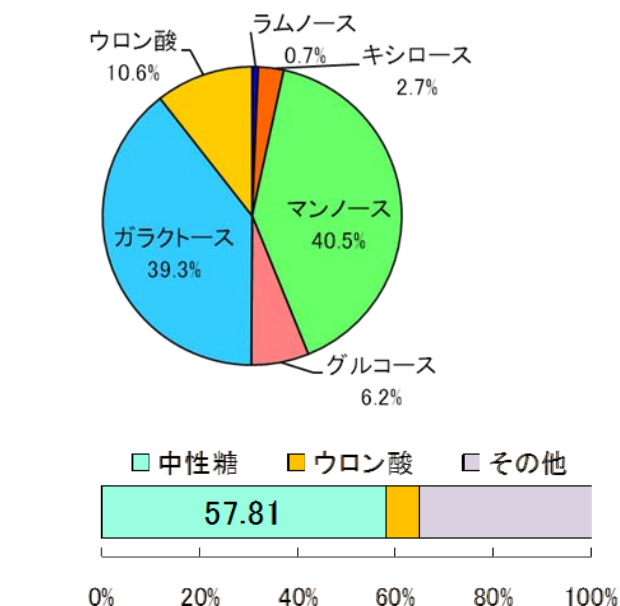
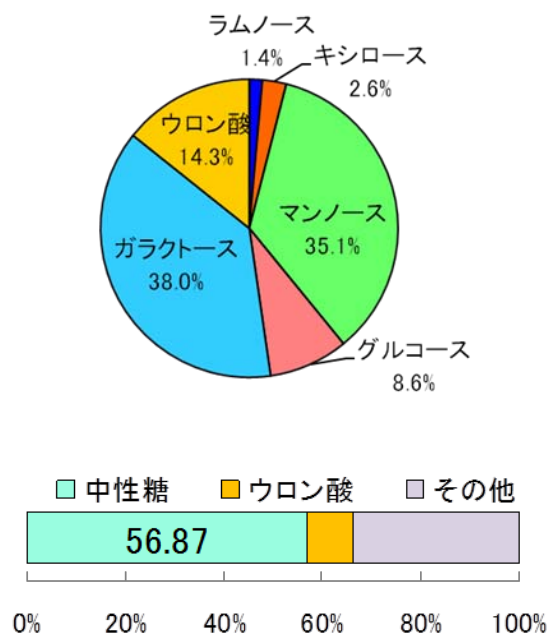


Fig.37 2'-1のEx-1の組成割合 (グルコース添加培地)

Fig.38 2'-1のEx-1の組成割合 (グルコース無添加培地)

上: 糖組成 下: 全体の組成

上: 糖組成 下: 全体の組成

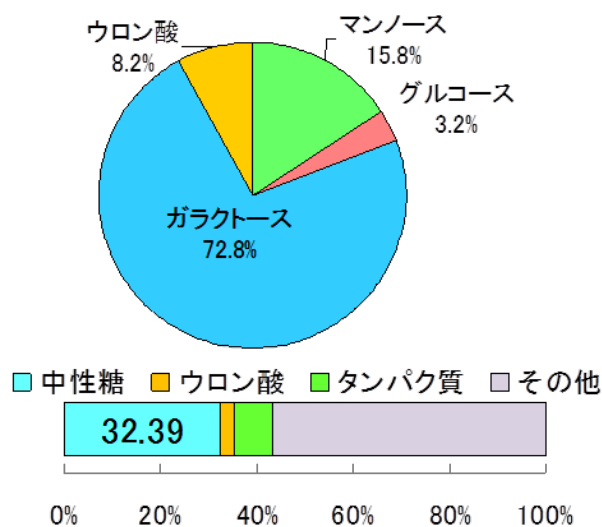
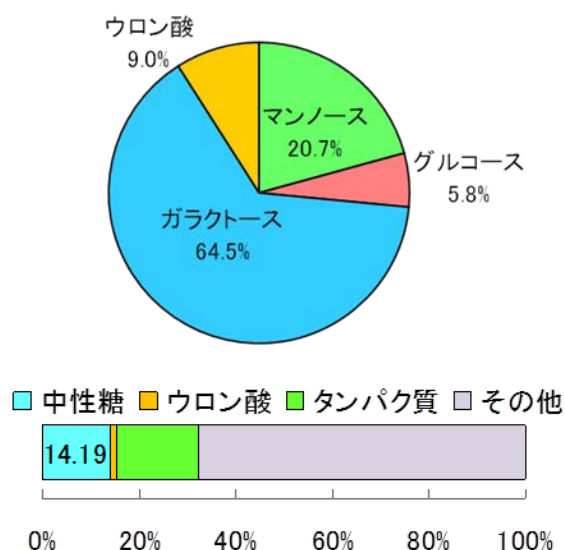


Fig.39 2'-1のEx-2の組成割合 (グルコース添加培地、限外濾過後エタノール沈殿させていない)

Fig.40 2'-1のEx-3の組成割合 (グルコース添加培地、限外濾過後エタノール沈殿させた)

上: 糖組成 下: 全体の組成

上: 糖組成 下: 全体の組成

Table.21 2'-1のExの組成割合

	ラムノース	キシロース	マンノース	グルコース	ガラクトース	ウロン酸	タンパク質	その他
グルコース添加培地	0.9342	1.7256	23.2768	5.7167	25.2201	9.4750	-	60.8381
グルコース添加培地 (限外濾過後エタノール沈殿させた)	0.0000	0.0000	5.5849	1.1347	25.6735	2.8771	8.059917	56.6730
グルコース添加培地 (限外濾過後エタノール沈殿させていない)	0.0000	0.0000	3.2338	0.9001	10.0529	1.4105	16.64192	67.7576
グルコース無添加培地	0.4212	1.7737	26.1638	4.0200	25.4330	6.8293	-	60.8381

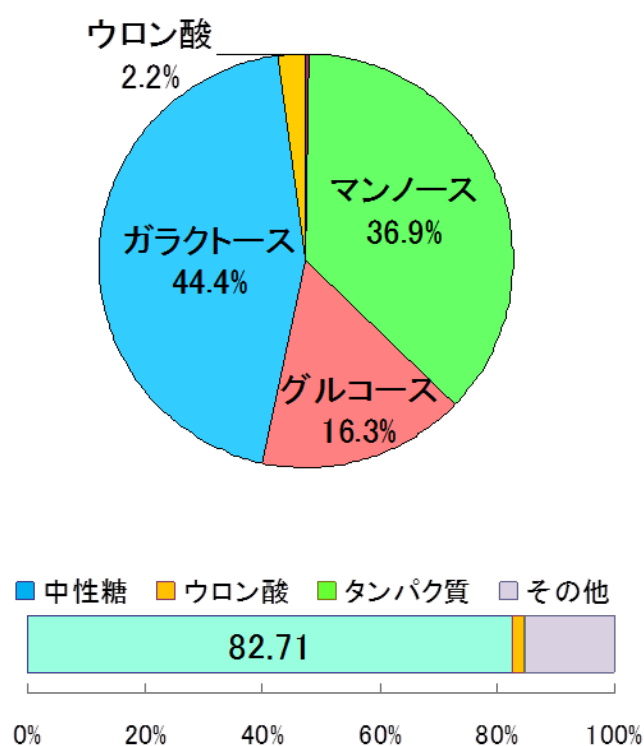


Fig.41 4BのCBの組成割合  
上:糖組成 下:全体の組成

Table.22 4BのCBの組成割合

ラムノース	キシロース	マンノース	グルコース	ガラクトース	ウロン酸	タンパク質	その他
0.0000	0.2147	31.1768	13.7771	37.5448	1.8477	0.1108	15.3281

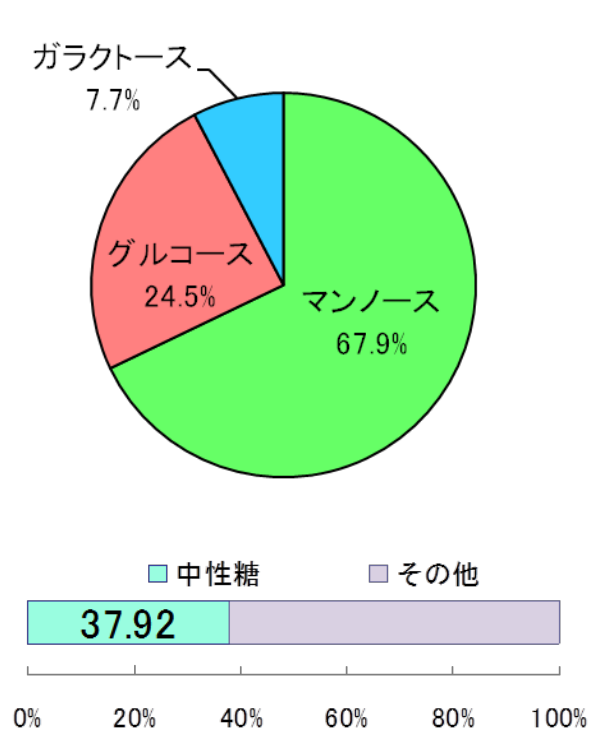


Fig.42 4BのExエタノール無添加培地

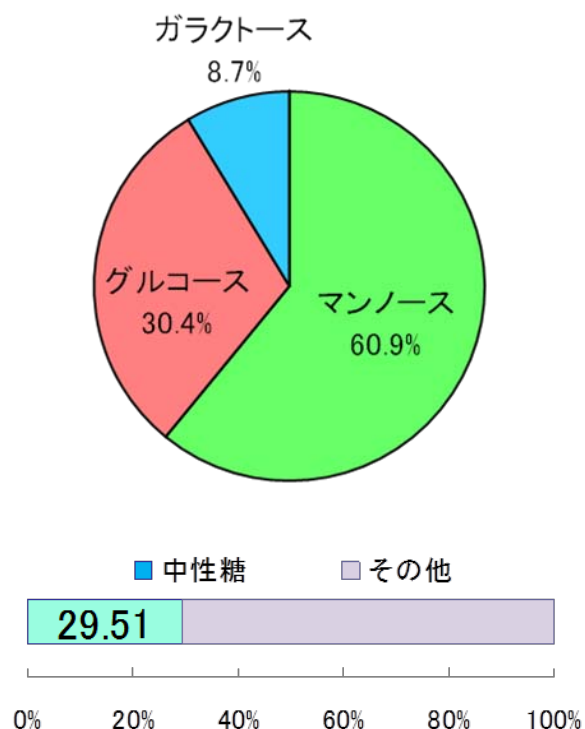


Fig.43 4BのExエタノール5%添加培地

Table.23 4BのExの組成割合

	ラムノース	キシロース	マンノース	グルコース	ガラクトース	その他
エタノール無添加培地	0.0000	0.0000	25.7388	9.2781	2.9059	62.0771
エタノール5%添加培地	0.0000	0.0000	17.9844	8.9610	2.5633	70.4914

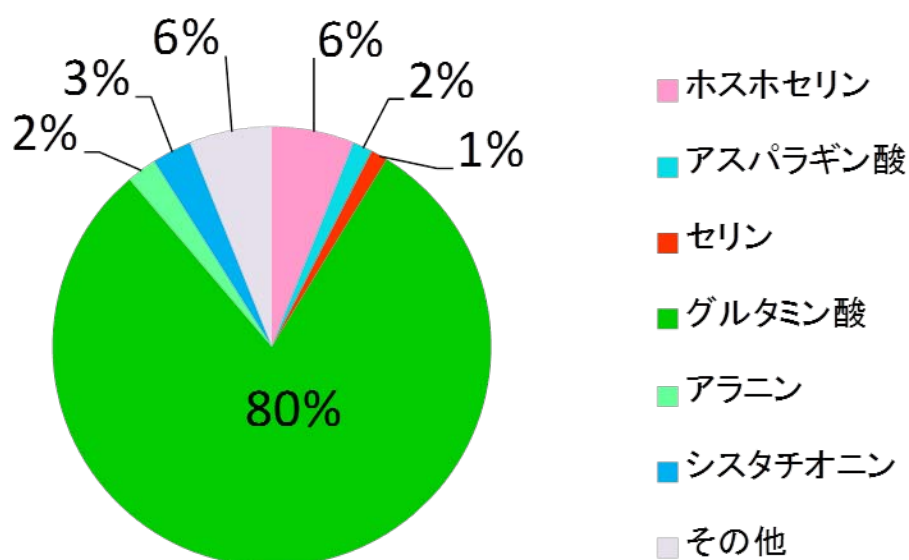


Fig.44 2'-1株のExのアミノ酸組成

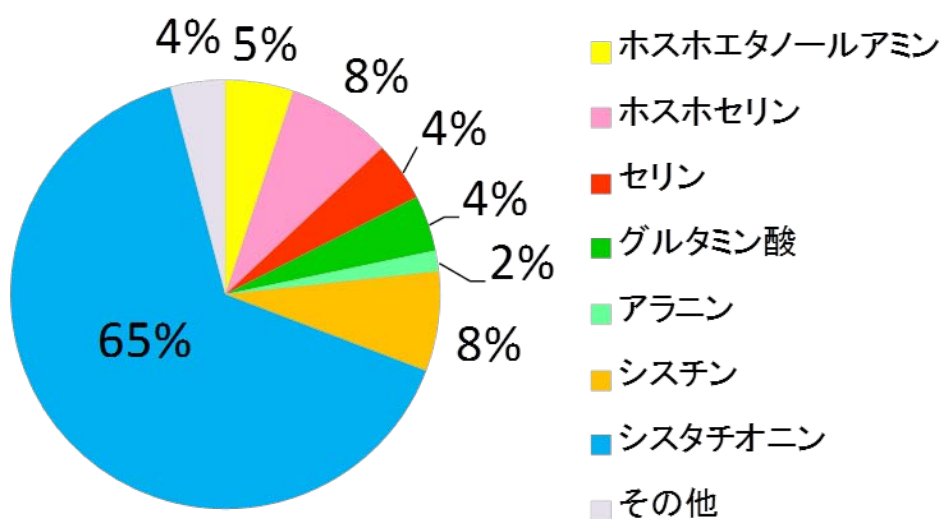


Fig.45 4BのCBのアミノ酸組成

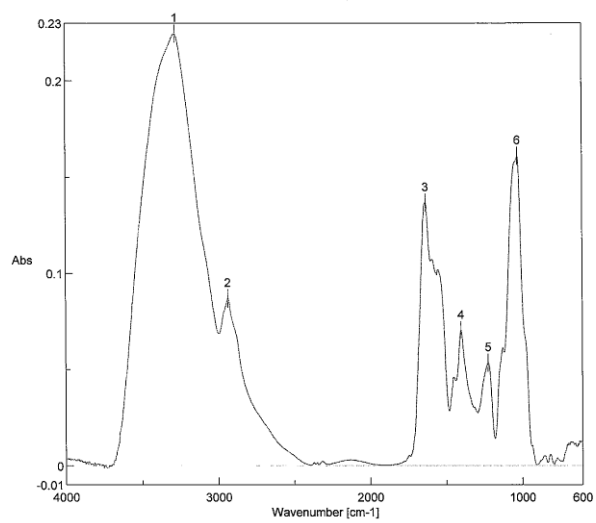


Fig.46 2'-1株のCBのスペクトル

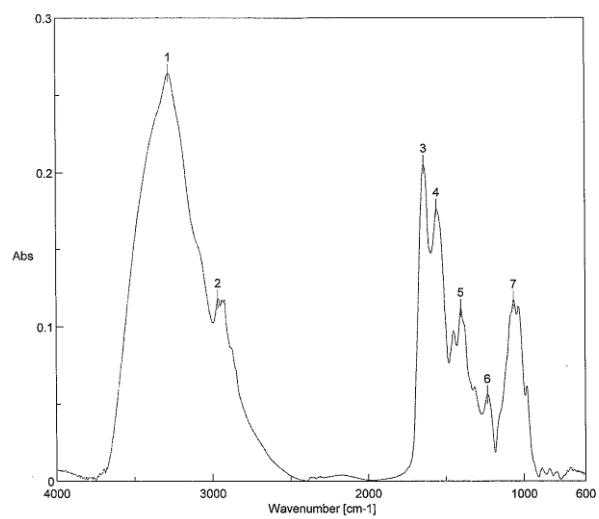


Fig.47 2'-1株のEx-1のスペクトル

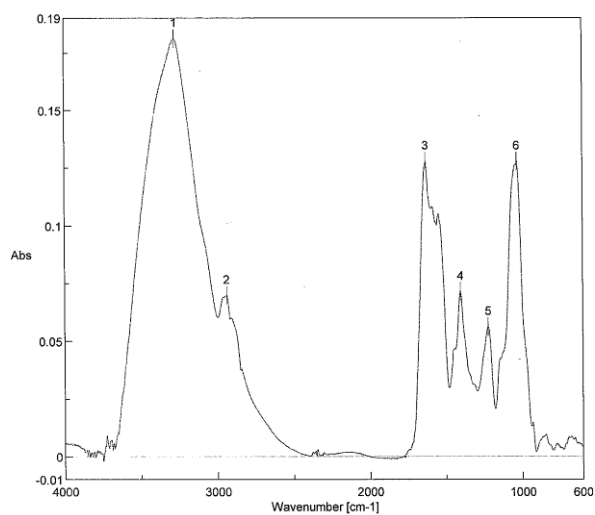


Fig.48 限外濾過後エタノール処理せずに回収した2'-1株のEx-2のスペクトル

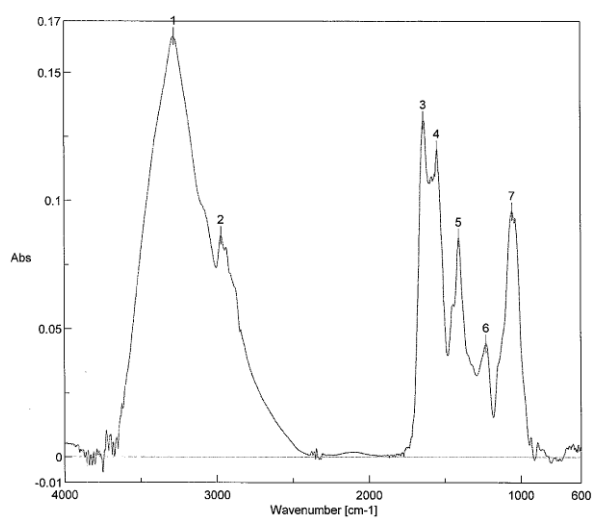


Fig.49 限外濾過後エタノール沈殿法により回収した2'-1株のEx-3のスペクトル

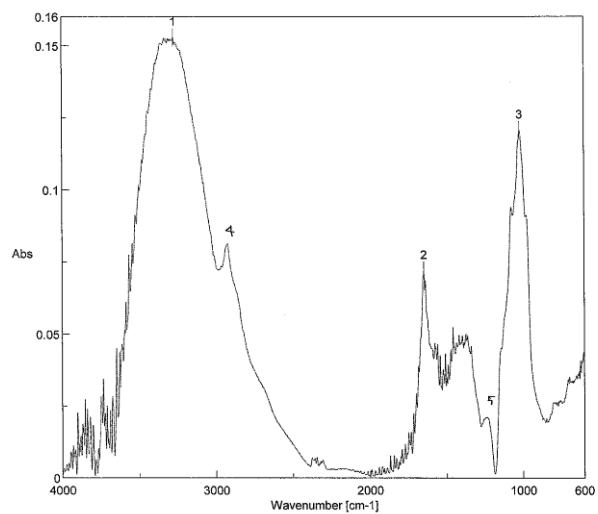


Fig.50 固液二層培地で培養した4BのCBのスペクトル

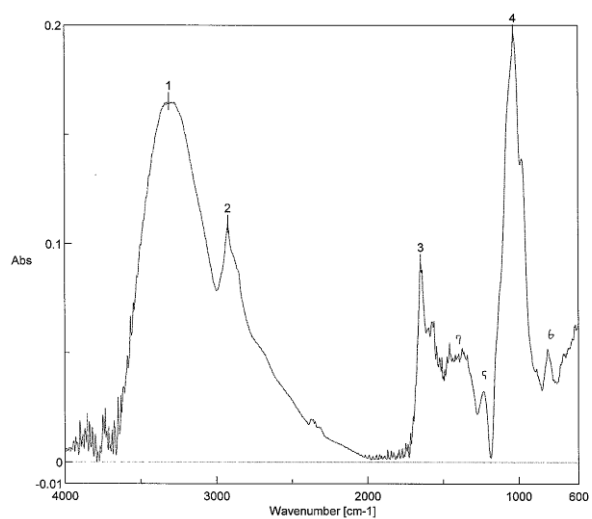


Fig.51 液体培地で培養した4B株のCBのスペクトル

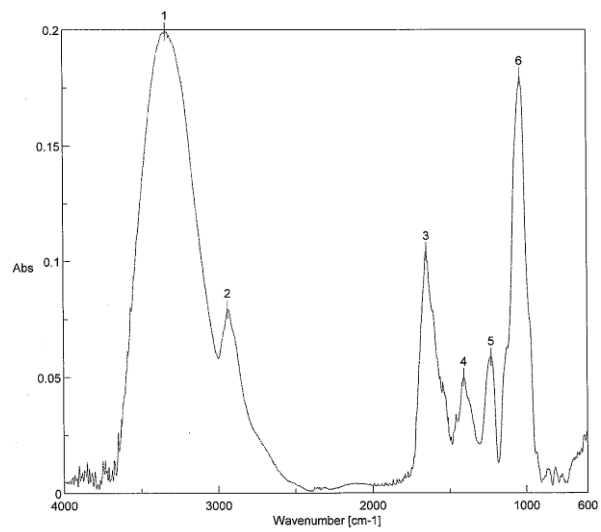


Fig.52 固液二層培地で培養した4BのExのスペクトル

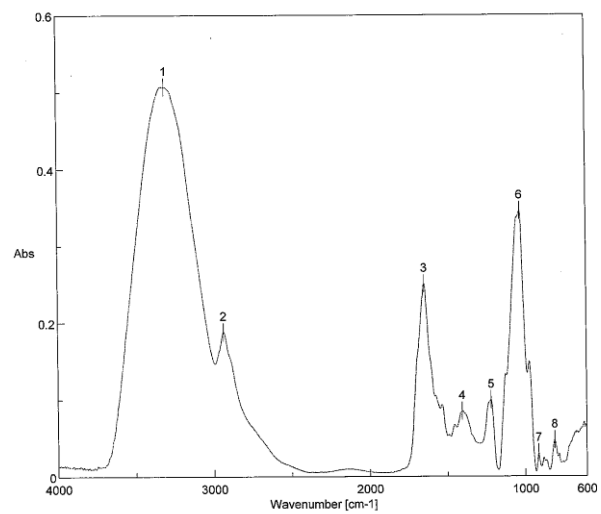


Fig.53 液体培地で培養した4B株のExのスペクトル



Table.24 サンプルの吸収バンドの強度とその特徴

波長 (cm <sup>-1</sup> )				3300	2930	1640	1550	1440	1404	1360	1220	1020-1070	914	805
帰属する特徴	タンパク質特有		第二アミド CONHR	M		S	M							
			COOH			S					S			
	糖特有		CH2OH	S					W	W		S		
			シクロアルカン		S				M			M	M	
			C-O-C									S		
吸収強度	4B	CB	液体培地	0.1651	0.1090	0.0911		W	W	W	0.0323	0.1964		0.0512
			二層培地	0.1528	0.0812	0.0720		W	W	W	0.0209	0.1207		W
		Ex	液体培地	0.5071	0.1881	0.2505		W	0.0857		0.0998	0.3458	0.0302	0.0472
			二層培地	0.1994	0.0793	0.1042		W	0.0500		0.0587	0.1798	W	W
	2'-1	CB	normal	0.2247	0.0869	0.1366		W	0.0704		0.0535	0.1609		
			normal	0.2644	0.1118	0.2054	0.1770	M	0.1119		0.0561	0.1174		
		Ex	限外ろ過後凍結乾燥	0.1641	0.0864	0.1313	0.1198	W	0.0855		0.0443	0.0958		
			限外ろ過後エタノール沈殿	0.1812	0.0698	0.1277		W	0.0714		0.0562	0.1277		

・第一アミド(CONH<sub>2</sub>)    ・第二アミド(CONHR)    ・第三アミド(CONR<sub>2</sub>)

・W:Week    ・M:Middle    ・S:Strong

※肩ピークなどで数値化できないピークは“W”と記載

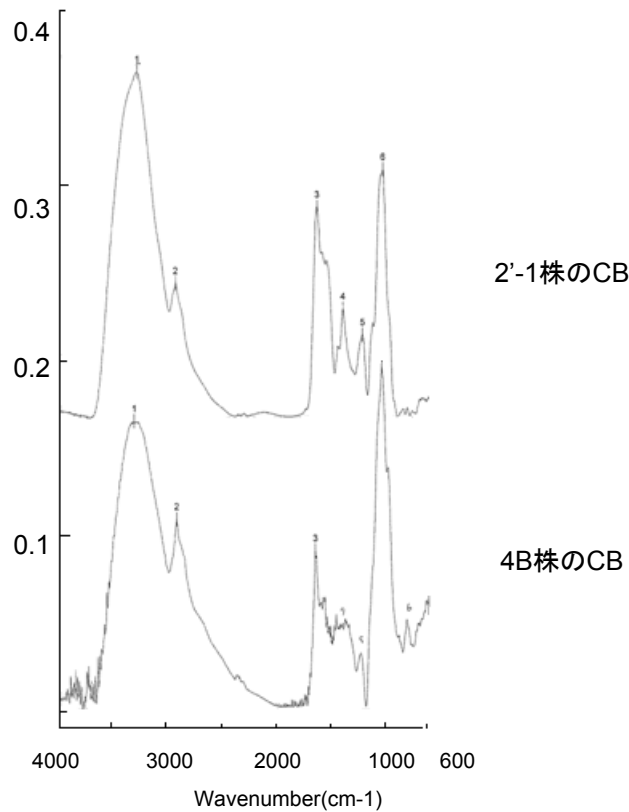


Fig.54 2'-1株のCBと4B株のCBの比較

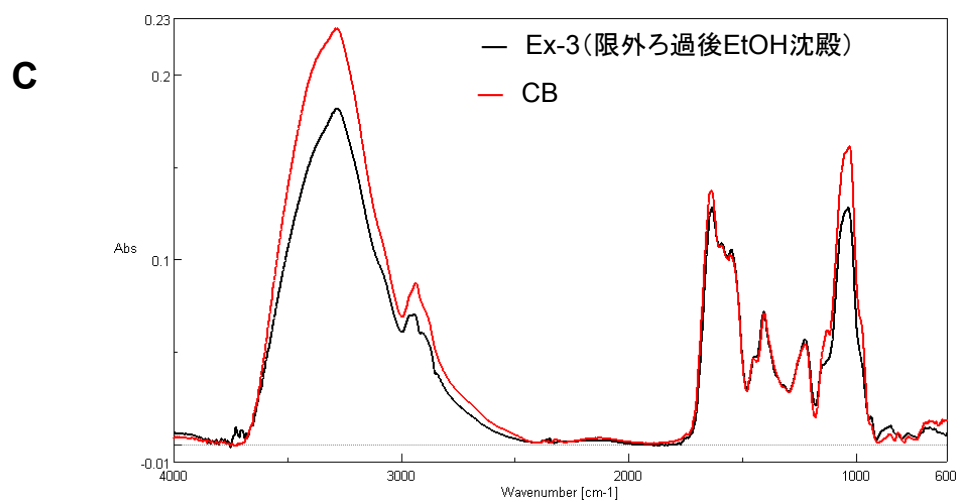
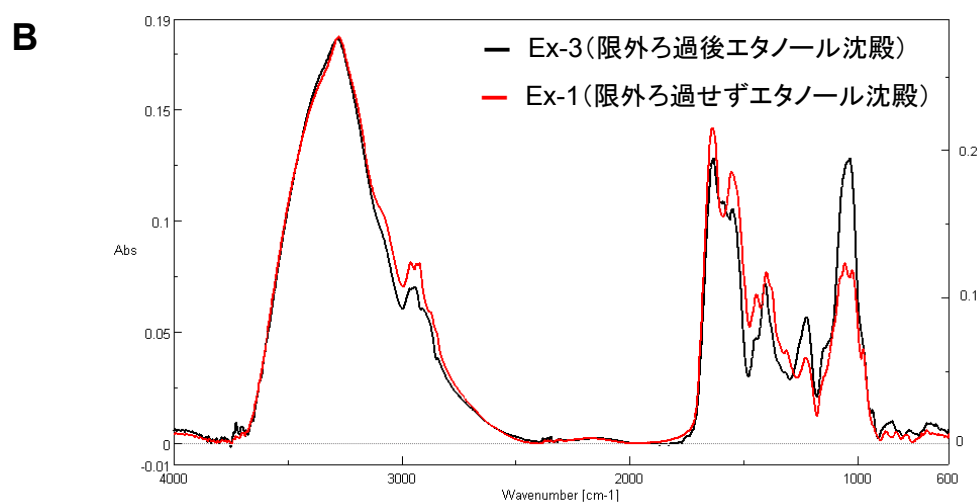
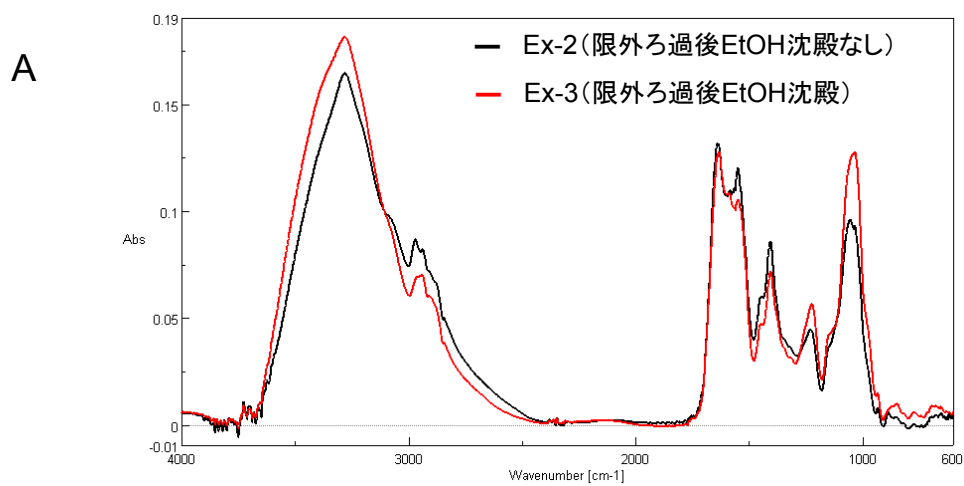


Fig. 55 2'-1株エタノール沈殿と限外ろ過による構造への影響

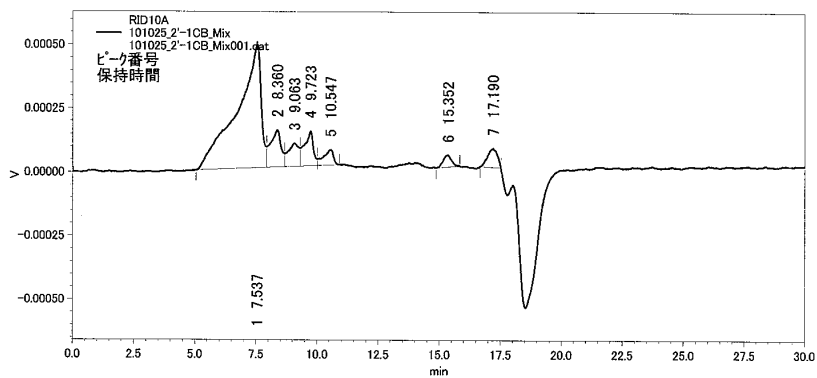


Fig.56 2'-1株のCBのピークグラフ

Table.25 分子量分布

時間(min)	Mw
7.537	66,686,000
8.36	10,016,000
9.063	4,269,890
10.547	2,048,220
15.352	818,693

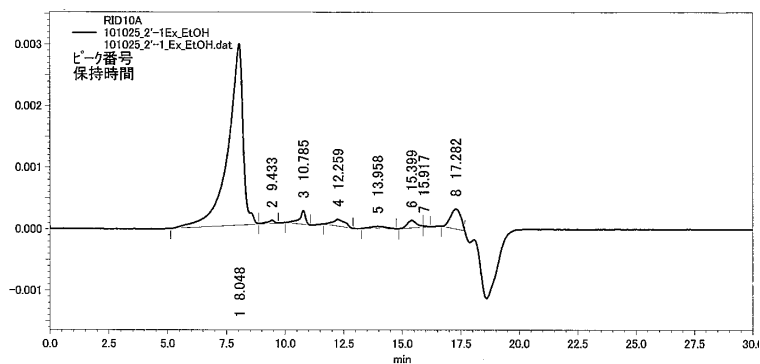


Fig.57 限外濾過後エタノール沈殿法により回収した2'-1株のExのピークグラフ

Table.26 分子量分布

時間(min)	Mw
8.048	23,941,300
9.433	2,902,580
10.785	599,419
12.259	89,837
13.958	12,665
15.399	2,240

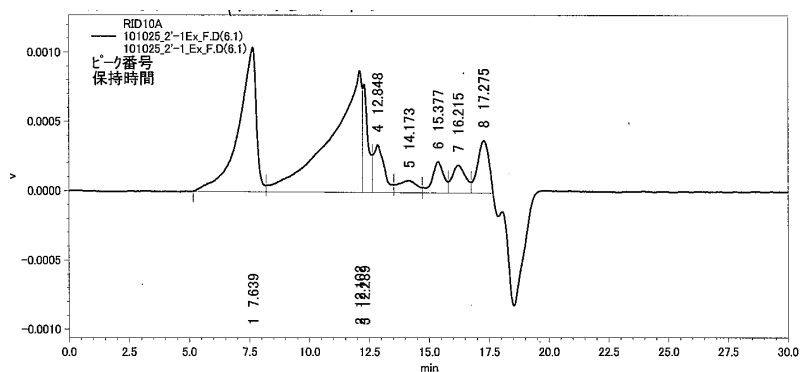


Fig.58 限外濾過後エタノール処理せずに回収した2'-1株のExのピークグラフ

Table.27 分子量分布

時間(min)	Mw
7.639	41,580,300
12.102	725,910
12.289	79,212
12.848	43,430
14.173	9,385
15.377	2,300
16.215	846

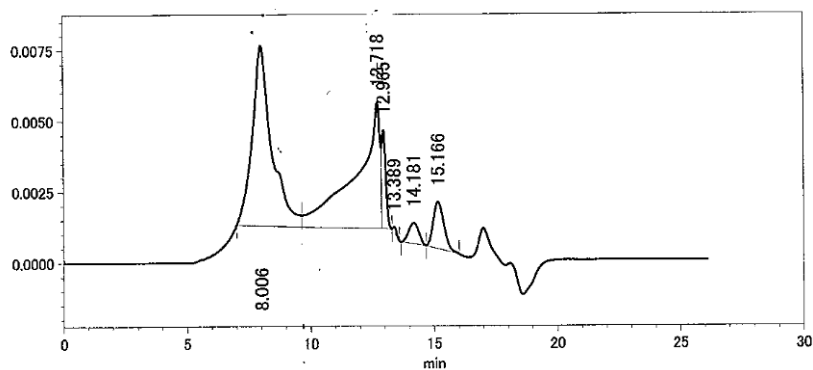


Fig.59 4B株のCBのピークグラフ

Table.28 分子量分布

時間(min)	Mw
8.006	11,998,100
12.718	284,190
12.965	45,532
13.389	28,105
14.181	12,173
15.166	3,858

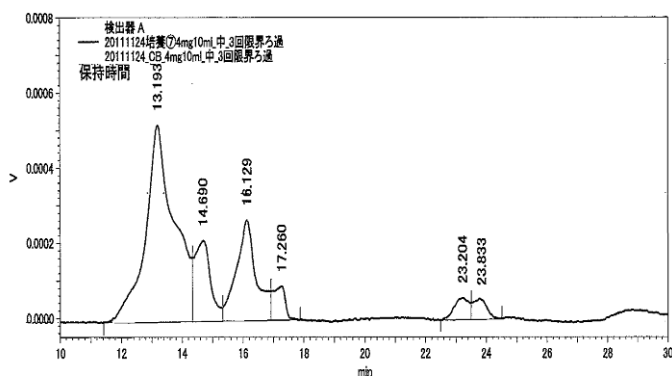


Fig.60 遠心式フィルターで限外濾過後の4B株のCBのピークグラフ

Table.29 分子量分布

時間(min)	Mw
13.193	11,197,100
14.69	4,356,480
16.129	1,795,810
17.26	900,052
23.204	20,061
23.833	13,304

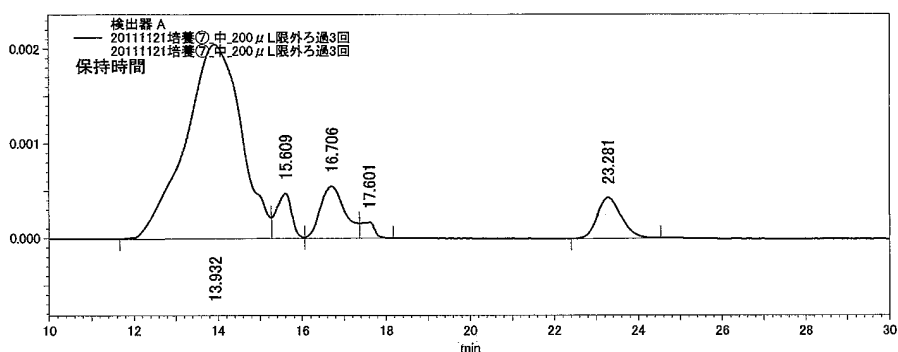


Fig61 遠心式フィルターで限外濾過後の4B株のCB2のピークグラフ

Table.30 分子量分布

時間(min)	Mw
13.032	79,783,400
15.609	2,509,720
16.706	1,191,410
17.601	703,984
23.281	18,166

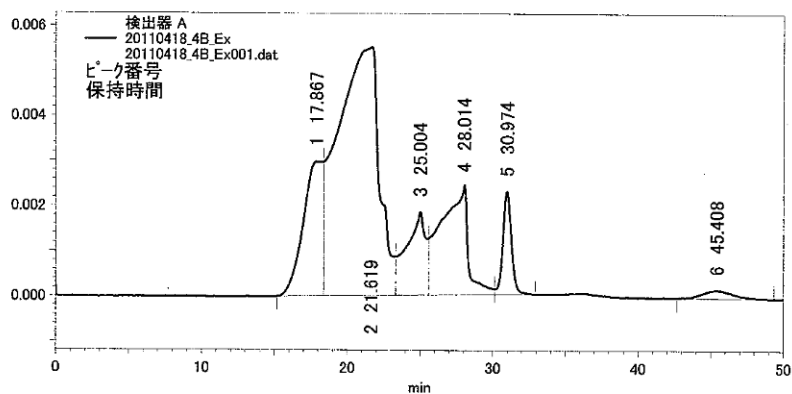


Fig.62 4B株のExのピークグラフ

Table.31 分子量分布

時間(min)	Mw
17.867	25,135,000
21.619	4,721,590
25.004	400,260
28.014	91,432
30.974	8,921

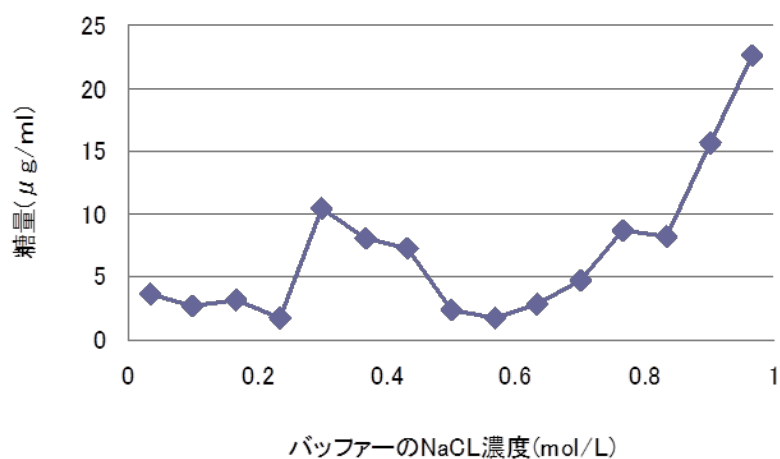


Fig.63 各フラクション中の全糖量

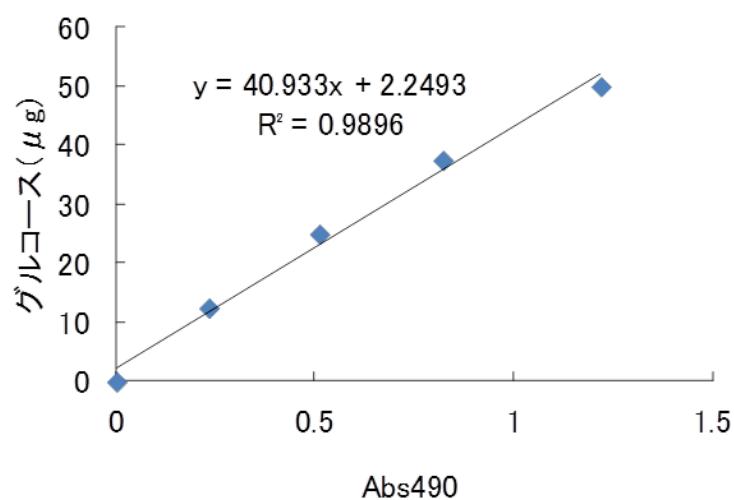


Fig. 64 グルコースの検量線

Table.32 グルコースの検量線

	グルコース濃度 (μg/ml)	Abs490	-blank
1	0	0.05	0
2	25	0.28	0.23
3	50	0.56	0.51
4	75	0.87	0.82
5	100	1.27	1.22

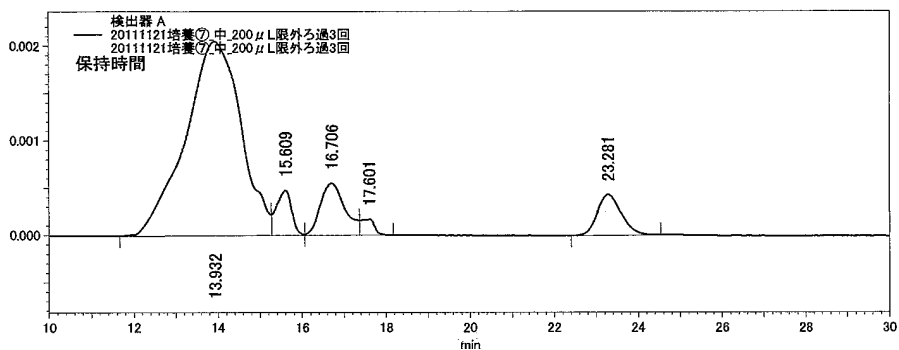


Fig.65 陰イオンクロマトグラフィーにかける前のクロマトグラフ(4BのCB2)

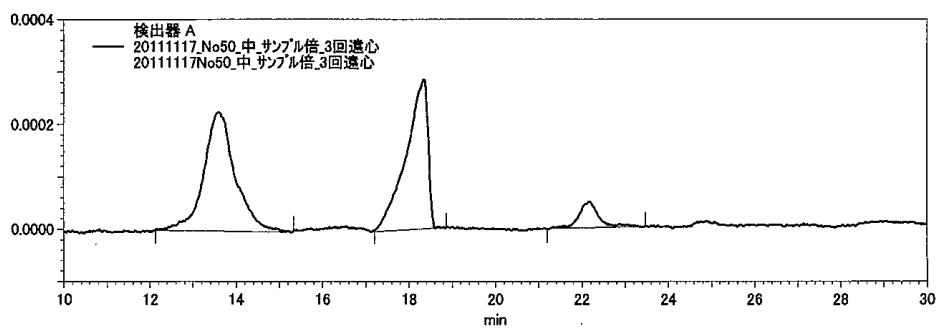


Fig.66 50本目のフラクションクロマトグラフ

13.592分・・・16,974,200 (Mw)

18.337分・・・ 744,231 (Mw)

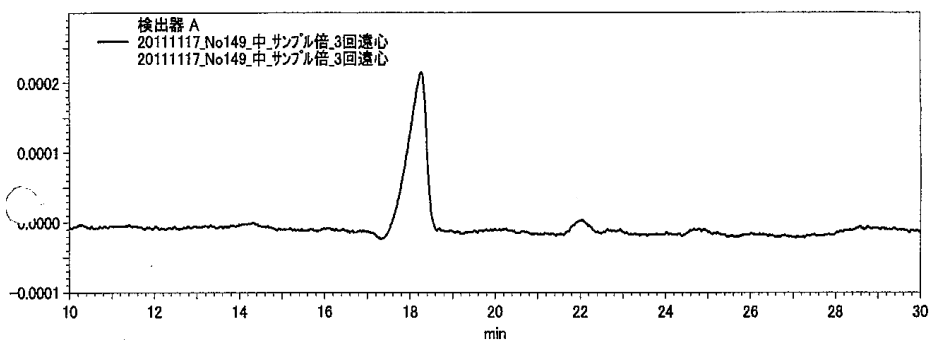


Fig.67 149本目のフラクションのクロマトグラフ

18.26分・・・ 728,820 (Mw)